

ACTA

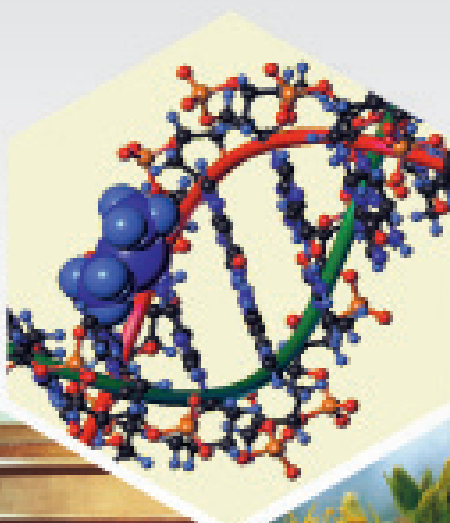
PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

3.

2011

APHGAO 81, (043) 97-136. (2011)



A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,
Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

<i>Prof. dr. Szabó László – 1931-2011.....</i>	99
<i>Lovász Norbert, Ducza Eszter, Gáspár Róbert, Falkay György: A K_{ATP} csatorna szulfonilurea alegységeinek ontogenezise a terhes patkány miometriumban</i>	101
<i>Pataki Hajnalka, Palásti Katalin, Vajna Balázs, Csontos István, Marosi György: Gyógyszerhatóanyag- kristályosodás valós idejű vizsgálata és módosítása segédanyaggal</i>	109
<i>Forró Enikő: Új enzimes stratégiák laktám és aminosav enantiomerek szintézisére</i>	125

CONTENTS

<i>Prof. Szabó, László – 1931–2011</i>	99
<i>Lovasz, N., Ducza, E., Gaspar, R., Falkay, G.: Ontogeny of sulphonylurea-binding regulatory subunits of K_{ATP} channels in the pregnant rat myometrium</i>	101
<i>Pataki, H., Palásti, K., Vajna, B., Csontos, I., Marosi, Gy.: Real-time monitoring of drug crystallization with and without additives</i>	109
<i>Forro, E.: New enzymatic strategies for enantiopure lactams and amino acids</i>	125

Acta Pharmaceutica Hungarica: www.mgyt.hu

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu

Felelős kiadó: Prof. Dr. Vincze Zoltán

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001–20530530

Adószám: 19000754–2–42

Előfizetési díj egész évre: 5133 Ft + 257 Ft áfa

Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 930 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: Print Invest Magyarország Kft., 9027 Győr, Almafa u. 13.

Felelős vezető: Ványik László ügyvezető igazgató

Megrendelés száma: 92 557, 2011. június

Index: 25 101

Prof. dr. Szabó László
1931-2011

Prof. dr. Szabó László, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar emeritus professzora, a Szerves Vegytani Intézet volt igazgatója, 2011. július 31-én, életének 81. évében váratlanul elhunyt. A gyászszertartásra hamvasztása után, engesztelő szentmise keretében augusztus 23-án Budapesten a Magyar Szentek Templomában került sor. A gyászszertartáson a közvetlen hozzátartozók, a Gyógyszerésztudományi Kar és az MGYT vezetői mellett nagy számban jelentek meg a volt munkatársak, a tanítványok és a tisztelők az ország különböző részeiből.

Az egyetem részéről *prof. Noszál Béla* dékán, a Szerves Vegytani Intézet munkatársai közül *Kocsis Ákos* mondott búcsúztatót.

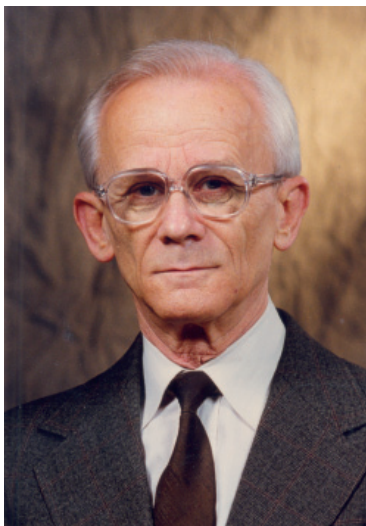
Prof. Noszál Béla dékán búcsúztató beszéde

„Mélyen tisztelt egyházi és világi gyászoló Társaim!

Pótolhatatlan veszteség érte a Semmelweis Egyetemet, a Gyógyszerésztudományi Kart, a Szerves Vegytani Intézetet, a magyar gyógyszerészképzést és az organikus kémia tudományát, amikor 2011. július 31-én elhunyt *Dr. Szabó László* professor emeritus, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Szerves Vegytani Intézet korábbi igazgatója, gyógyszerész generációk avatott és elhivatott szerves kémia oktatója.

1931. április 15-én született Szentgotthárdon. Középiskolai tanulmányait a Vörösmarty Mihály gimnáziumban végezte. 1949-ben felvételt nyert a Pázmány Péter Tudományegyetem Gyógyszerész Szakára, ahol 1954-ben kitüntetéses oklevelet kapott.

Életében egyetlen munkahelye volt, ahol 58 dolgozó és eredményes évet töltött el. 1953. július 15-től 2001. június 30-ig volt a Semmelweis Egyetem, ill. a jogelőd egyetemek munkatársa, először az Orvosi Vegytani Intézetben, majd 1957-től az akkor megalakuló Szerves Vegytani Intézetben. Dr. Clauder Ottó egyetemi tanár munkatársaként



részt vett ez utóbbi megalapításában és megszervezésében, ahol – paradox módon – korábban került intézeti státuszba, mint az alapító Clauder professzor. 1953-tól egyetemi gyakornok, 1956-tól egyetemi tanársegéd, 1966-tól egyetemi adjunktus, 1977-től egyetemi docens, 1980-tól egyetemi tanár, 1977-től a Szerves Vegytani Intézet megbízott vezetője, 1980-tól 1996-ig igazgatója volt. 2001. július 1-től professor emeritus a Semmelweis Egyetemen.

Fő kutatási területe: természetes vegyületek kémiája, alkaloidok (elsősorban indolalkaloidok) és iridoidok (elsősorban szekologanin), heterociklusos kémia (kinolizinszármazékok szintézise és tulajdonságai), polimer hordozós szintézis. Munkatársaival részletesen tanulmányozta a szekologanin kémiáját. Ennek során elsőként igazolta az indolalkaloidok biogenetikai prekursorának, a sztriktozidinnek a teljes térszerkezetét, számos kémiai és biomimetikus átalakítást végzett, gráfanalízissel vizsgálta a reakciók diverzitásának és szelektivitásának kérdését. Elmélyült az elméleti szerves kémia, különösen a perturbációs molekulapálya elmélet kérdéseiben, létrehozta a szekologaninból származó indolvázis alkaloidok bioorganikus rendszerét.

Tagja volt a Magyar Tudományos Akadémia Alkaloidkémiai Munkabizottságának és Elméleti Szerves Kémiai Munkabizottságának, 1979 és 1994 között elnöke az Egyetem Külső Kutatási Szerződések Véleményező Bizottságának. Tagja volt a Gyógyszerészet és az Acta Pharmaceutica Hungarica Szerkesztőbizottságának, elnöke volt a Magyar Gyógyszerészeti Társaság Gyógyszerkutató Szakosztályának. Bár a legkevésbé sem kereste a szereplést és a látványos sikereket, nem kerültek el a kitüntetések sem. 1977-ben Kiváló Gyógyszerész, 1983-ban a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Kiváló Oktatója kitüntetést kapott, 2004. július 1-jén a Winkler Lajos Emlékéremmel tüntették ki. 2010-ben a Gyógyszerésztudományi Kar felterjesztette a Magyar Köztársasági Érdemrend Lovagkeresztje kitüntetésre. E magas elismerést

2011. március 15. alkalmából – 80. születésnapjához igen közeli időpontban – vehette át Réthelyi Miklós miniszter úrtól. A kitüntetéshez és a 80. születésnaphoz tartozó laudációt abban a jogosnak látszó optimizmusban írhattuk, hogy egészsége töretlen, vitalitása nagyobb, mint valaha.

A 2010/2011-es tanévben nem kevesebb, mint két kötelezően választható kurzust – az Elméleti szerves kémiát és a Természetes vegyületek kémiáját – oktatta úgy, hogy valamennyi előadást maga tartotta. Oktatóként, kutatóként, vezetőként egész életében puritán szigorúságot követelt meg munkatársaitól, de legfőképpen önmagától. A Gyógyszerésztudományi Kar jubileumi díszoklevél-átadási ünnepségeinek számos évben volt szónoka. E tisztségében is osztatlan elismerést arattak az egyes oklevél-típusokhoz tartozó természettudományos megalapozottságú, egyben azonban irodalmi értékű sajátos kommentárjai, melyek felejtetetlen emléket okoztak az 50, 60, 65 és annál is több éve végzett jubiléum pályatársainak. Intellek-

tuális sokoldalúságát mutatja, hogy – szerves kémikusként – 15 éven át felvételiztetett fizikából, valamint, hogy kedvelője és magas szinten értője volt a komoly zenének. Szeretett munkahelyén élete utolsó hetében is töretlen hittel, szorgalommal, a felsőoktatás, a tudomány és a haza iránti elkötelezett alázattal dolgozott. Egész életében hívő katolikusként élt, vallását az utóbbi 20 évben itt, a Magyar Szentek Templomában gyakorolta.

A Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kara és Szerves Vegytani Intézete saját halottjának tekinti.

Mélyen tisztelt Szabó Professzor Úr!

Kiváló Oktatónk, nagyra becsült Kollégánk, szeretett Barátunk, nyugodjál békében!"

Az engesztelő szentmisét és a búcsúbeszédet követően prof. dr. Szabó László hamvainak „lehelvezésére” a Magyar Szentek Templomának altemplomában került sor.

(-)

A K_{ATP} csatorna szulfonilurea alegységeinek ontogenezise a terhes patkány miometriumban

LOVÁSZ NORBERT, DUCZA ESZTER, GÁSPÁR RÓBERT, FALKAY GYÖRGY

Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet, Szeged, Eötvös utca 6. – 6720
Levelezési cím: falkay@pharm.u-szeged.hu

Summary

Lovasz, N., Ducza, E., Gaspar, R., Falkay, G.: *Ontogeny of sulphonylurea-binding regulatory subunits of K_{ATP} channels in the pregnant rat myometrium*

K_{ATP} channels are composed of sulphonylurea receptors (SURs) and potassium inward rectifiers ($Kir_{6,x}$) that assemble to form a large octameric channel. This study was designed to examine the expression and role of sulphonylurea-binding regulatory subunits 1 [SUR1 (ABCC8)] and 2 [SUR2 (ABCC9)] of the K_{ATP} channels in the pregnant rat myometrium with particular regard to the contractility. RT-PCR and Western blot analysis were performed to detect the presence of SUR1 and SUR2. The SUR1 levels were markedly increased in the early stages of pregnancy. The highest level was detected on day 6 of pregnancy, while in the late stages the levels of SUR1 were significantly decreased. The SUR2 level remained unchanged throughout pregnancy. The SUR-non-selective diazoxide and the SUR2-selective pinacidil inhibited oxytocin-induced contractions. Glibenclamide, a K_{ATP} channel blocker, antagonized both pinacidil and diazoxide-induced relaxations. It was established that SURs are responsible for pharmacological reactivity of K_{ATP} channel openers. We conclude that, both SURs are involved in the K_{ATP} channel in the pregnant rat myometrium. It may further be concluded that "pinacidil-like" K_{ATP} channel openers may be of therapeutic relevance as tocolytic agents in the future.

Keywords: pregnant rat uterus, potassium channels, SUR, potassium channel openers

Összefoglalás

Az ATP szenzitív K^+ -csatornákat (K_{ATP}) szulfonilurea (SUR) és befelé irányuló K^+ -csatorna fehérje ($Kir_{6,x}$) alegységek alkotják hetero-oktamer szerkezetben. Jelenlegi kísérleteink célja a K_{ATP} csatorna SUR alegységeinek vizsgálata (SUR1/ABCC8 és SUR2/ABCC9) a terhes patkány uterus kontraktilitásának szabályozása kapcsán. A SUR1 és SUR2 alegységek vizsgálatára RT-PCR és western blot technikát alkalmaztunk. A SUR1 alegység expressziója esetén karakterisztikus változást találtunk: a terhesség elején jelentősen megemelkedett, míg a terhesség végéhez közeledve folyamatosan csökkent. A SUR2 alegység expressziója esetén nem tapasztaltunk változást a terhesség alatt. Korábbi vizsgálatok megerősítették azt, hogy a SUR alegységek felelősek a K_{ATP} csatorna agonisták farmakológiai reaktivitásáért. A nem szelektív SUR agonista, diazoxid és a SUR2 szelektív, pinacidil gátolta az oxytocin indukálta uterus kontrakciókat. Glibenklamid, K_{ATP} csatorna antagonistá gátolta mind a diazoxid, mind a pinacidil által kiváltott uterus relaxációt.

Eredményeink alapján kimondható, hogy mindkét SUR alegység kimutatható a patkány uterusban terhesség alatt. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei alapján a jövőben egy „pinacidil-szerű” K_{ATP} csatorna agonista fontos szerepet játszhat a korai fájástevékenység és koraszülés terápiájában, mint tokolitikum.

Kulcsszavak: terhes patkány uterus, kálium csatorna, SUR, kálium csatorna agonista.

Bevezetés

Az ABC-transzporterek (ATP-binding cassette transporters, ATP-kötő kazetta transzporterek) az egyik legnagyobb és legősibb fehérjecsalád tagjai. Képviselői megtalálhatók minden létező taxonban a prokariótaktól az emberig. Ezek a transzmembrán fehérjék számos anyag membránon való átjutását végezhetik, a sejtmembránon vagy a sejt belső membránjain keresztül. Nevüket a sajátos szerkezetű ATP-kötő régióról kapták, amelyeken belül jól elkülöníthető szekvencia-motívumok találhatók. Jelenlegi ismereteink szerint valamennyi ABC transzporter működéséhez két alegység szüksé-

ges; egy ATP-kötő úgynevezett nukleotid kötő (NBD) régió, és hat membránon áterő fehérjeszakai tartalmazó, transzmembrán (TMD) régió. Az NBD a citoplazma felől foglal helyet, szerepe az ATP hidrolízise, amely az energiát szolgáltatja transzport folyamatokhoz. A TMD a membránban foglal helyet, szerepe az ioncsatorna képzés, a tulajdonsága alapvetően meghatározza a transzportált anyagok jellegét. A transzportfehérjék szerepe nem egységes; a prokariótákban elsősorban az influx mechanizmus jellemző, míg az eukariótákban mind az influx és efflux. Az efflux során a citoplazmában elhelyezkedő NBD-on történő ATP hidrolízisből keletkező energia a szubsztrátot át-

nyomja a TMD által kialakított csatornán. Az influx során a TMD-nek nemcsak az ioncsatorna képzés a szerepe, hanem a szubsztrát megkötése is. A tudomány jelenlegi állása szerint mintegy 49 (2009) humán ABC transzportfehérjét ismerünk, melyeket hét alcsaládba soroljuk ABCA-tól ABCC-ig. Az egységes nevezéktan megteremtésében a Human Genome Organization (HUGO) fontos szerepet játszik. Az ABC transzporterek nevezéktanával kapcsolatosan az alábbi cím nyújt segítséget: <http://www.genenames.org/genefamily/abc.html>. A 49 humán ABC transzporterből 46 tölt be valódi transzporter funkciót, a maradék három; ABCC7, ABCC8 és ABCC9 ioncsatorna regulátorként működik [1]. Az ioncsatornáknak, ezen belül a K^+ csatornáknak alapvető szerepe van a membránpotenciál alakulásában, ezáltal számottevően befolyásolják a celluláris folyamatokat. Különböző K^+ csatornákat ismerünk; kalciumfüggő-, feszültségfüggő- és ATP-szenzitív K^+ csatornákat (K_{ATP}) [2]. Az ABC transzporterek közül két fehérje az ABCC8 és az ABCC9 játszik szerepet a K_{ATP} -csatornák felépítésében. Ezekre a csatornákra a hetero-oktamer szerkezet jellemző; 4 db Kir.6.x alegységet (befele irányuló K^+ csatorna fehérje) és 4 db szulfonilurea (SUR) alegységet tartalmaznak. A Kir.6 alegységek két altípusa ismert a Kir 6.1 és Kir 6.2, melyek a csatorna belső részén foglalnak helyet, szerepük a csatornaképzés. A SUR alegységek az ABC transzporterek családjába tartozó ABCC8 és ABCC9 vagy más néven SUR1 és SUR2. A SUR2-nek két izoformja ismert: SUR2A és SUR2B. A SUR alegységek meghatározzák a csatorna farmakológiai tulajdonságait és felelősek az ATP kötődésért. Azonban ahhoz, hogy K_{ATP} -csatorna funkcionáljon mind a Kir és a SUR alegységek szükségessége [3, 4, 5]. A K_{ATP} -csatornák szerkezete nem egységes az alegységek változatos expressziója miatt. Így változatos molekuláris szerkezetű és eltérő farmakológiai tulajdonságokkal rendelkező K_{ATP} -csatornákat kapunk; a hasnyálmirigy β -sejtjeiben Kir 6.2 /SUR1 [6], a szívben Kir 6.2 /SUR2A [7], a vaszkuláris simaizomban Kir 6.1 /SUR2B, míg a nem vaszkuláris simaizomban Kir 6.2 /SUR2B [8] felépítésű K_{ATP} -csatornák találhatók. A K_{ATP} -csatornák nyitása K^+ kiáramláshoz vezet, mely a membránpotenciált a K^+ egyensúlyi potenciálja felé viszi, mely szöveti kontraktilitás csökkenéshez vezet. A K_{ATP} -csatorna nyitását serkentő anyagok (KCO) – mint például a diazoxid és pinacidil – jó simaizom relaxáló hatással bírnak. A simaizom relaxáló hatásukat már bizonyították nem terhes patkány uteruson [9]. A hatásukban

azonban alapvető különbségek mutatkoznak; míg a diazoxid olyan csatornákon képes hatni, amelyek vagy SUR1-t vagy SUR2-t tartalmaznak, addig a pinacidil csupán csak akkor hatásos, ha a csatornában SUR2 található [10, 11].

Kísérleteink során célul tűztük ki a K_{ATP} -csatornák SUR alegységeinek meghatározását a terhességi idő függvényében, valamint lehetséges összefüggések keresését a KCO (pinacidil és diazoxide) farmakológiai reaktivitása és a K_{ATP} -csatornák felépítése között.

Anyagok és módszerek

Az állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottságának és a Csongrád Megyei Mezőgazdasági, Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével végeztük (engedélyszám: IV./01758-21/10082).

Állatkísérletek

Az állatok pároztatása

Ivarérett nőtény (180-200 g) és hím (240-260 g) Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk. A pároztatás kezdetétől számított 4-5 órán belül a nőtény állatoktól hüvelykenetet vettünk és mikroszkóp alatt hímivarsejteket kerestünk. Amennyiben a keresés pozitív eredménnyel zárult, akkor az állatot elkülönítettük, mint az 1. napos vemhes nőtényt.

Real-Time PCR analízis

A PCR vizsgálatokat nem terhes valamint 6, 8, 10, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 22 napos terhes uterusokkal végeztük, valamint a terhesség 6. illetve 10. napján implantációs és interimplantációs helyeket külön gyűjtve is feldolgoztuk. A mintákat folyékony nitrogénben fagyaszttva mechanikusan porítottuk Sartorius Mikro Dismembrator segítségével. Ezután a mintákból PARIS Kit (Life Technologies, Hungary) segítségével RNS-t és fehérjét izoláltunk. Az RNS mennyiségi és minőségi meghatározása nanodrop technika alkalmazásával (Bio-spec Nano, Shimadzu Biotech) történt. A reverz transzkripció (RT) lépésben 2 μ g RNS-t és High Capacity RNA-to-cDNA Kitet (Life Technologies, Hungary) használtunk. A felsokszorozás TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Hungary) alkalmazásával ABI StepOne Real-Time

cycler gépen történt. A következő primereket használtuk: assay ID ABCC8/SUR1: Rn01476318_m1, ABCC9/SUR2: Rn01463198_m1 és endogén kontrollként a gliceraldehid-3-foszát dehidrogenázt (GAPDH): Rn99999916_s1.

Western blot analízis

Mintánként 30 µg fehérjét 4-12%-os NuPAGE Bis-Tris Gel (Life Technologie, Hungary) gélen elektroforézisnek vetettünk alá. A fehérjét a nitrocellulóz (Scheicher and Schuell, Germany) membránra helyeztük át, félszáraz blottoló eljárással (Bio Rad). Mosás után a membránt szobahőmérsékleten SUR1, SUR2 és GAPDH poliklonális antitestekkel (Santa Cruz Biotechnology, California, 1:200), blokkoló pufferben 1 órán át inkubáltuk. Az immunreaktív sávokat WesternBreeze Chromogenic Western blot immune detection kit (Invitrogen, Hungary) segítségével láthatóvá tettük, majd elektronikusan rögzítettük az EDAS290 imaging system (KODAK, Invitrogen, Hungary) segítségével. Az optikai denzitás meghatározása Kodak 1D Images software-rel történt.

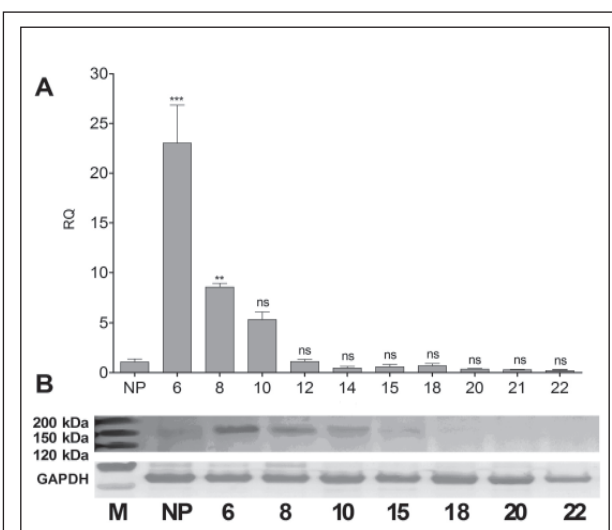
Uterus preparálása, KCO hatásának vizsgálata oxytocin indukálta kontrakciókra

Kísérleteink során nem terhes valamint 6, 8, 18 és 22 napos terhes patkány uterusokat használtunk. Az állatok CO₂-al történő leölése után az uterusokból 5 mm hosszúságú gyűrűket metszettünk. A preparátumokat karbogénnel átáramoltattott de Jongh oldatot tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőbe helyeztük (de Jongh oldat összetétele mM-ban: 137 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 12 NaHCO₃, 4 NaH₂PO₄, 6 glükóz, pH: 7.4). Az inkubálási periódus (4 x 15perc) letelte után az uterus kontrakciókat oxytocinnal (10⁻⁶ M) váltottuk ki, majd megkezdjük a pinacidil és diazoxid (10⁻⁸-10⁻⁴ M) adagolását. Az adagolást nem kumulatív módon végeztük. Vizsgálatainkat K_{ATP}-csatorna blokkoló glibenklamid (10⁻⁶ M) jelenlétében is elvégeztük 6, 8 és 22 napos terhes uteruson. A pinacidil és diazoxid (Sigma-Aldrich, Hungary) gátló hatását az oxytocin által kiváltott ritmikus kontrakciókhoz viszonyítottuk és a kontrakciós görbék alatti területet értékeltük a kontroll AUC-hez viszonyítva, 5 percet értékelve. A görbék regisztrálását, az adatok rögzítését és feldolgozását ISOSYS DataAcquisition System (Experimenta Kft., Hungary) segítségével végeztük. Az eredmények statisztikai elemzését a Prism 5.0 (GraphPad

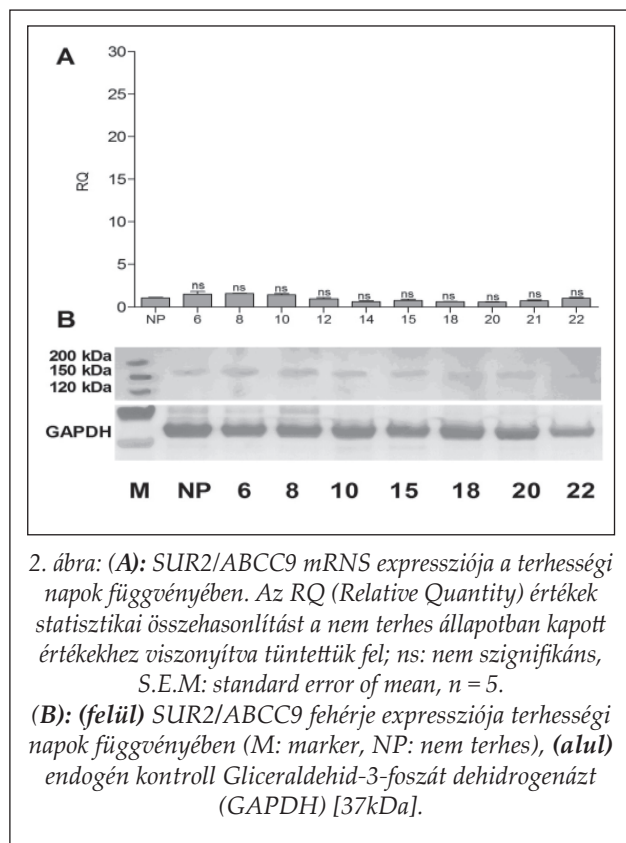
Software, USA) segítségével ANOVA Newman-Keuls teszttel végeztük.

Pinacidil hatásának vizsgálata EFS indukálta kontrakciókra

A pinacidil hatását EFS (Elektromos Térerő Ingerlés) indukálta kontrakciókon is megvizsgáltuk nem terhes valamint 22 napos terhes uterusokon. Az uterus preparálása a fent említett módon történt, azzal a kivétellel, hogy ebben az esetben a szöveteket egy speciális szervtartóra rögzítettük, amelyen két platina elektród található. A szövetet a két elektród közé erősítettük, majd a kontrakciókat elektromos térerőingerléssel indukáltuk. Ebben az esetben a pinacidil hatásának vizsgálatát kumulatív módon végeztük 20 perces TEA (tetraetil-ammónium) (10⁻³ M) előinkubálás után. A kísérlet paraméterei a következők voltak; PW: 30 s (egy elektromos stimulus hossza) és PP: 50 ms (két elektromos stimulus közt eltelt idő). A pinacidil gátló hatását az EFS által kiváltott ritmikus kontrakciókhoz viszonyítottuk és a kontrakciós görbék alatti területet értékeltük a kontroll AUC-hez viszonyítva. A görbék regisztrálása, az adatok rögzítése és feldolgozása, az eredmények statisztikai elemzése az előzőekben leírtak szerint történt.



1. ábra: (A): SUR1/ABCC8 mRNA expressziója a terhességi napok függvényében. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítást a nem terhes állapotban kapott értékekhez viszonyítva tüntettük fel; ns: nem szignifikáns, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, S.E.M: standard error of mean, $n = 5$. (B): (felül) SUR1/ABCC8 fehérje expressziója terhességi napok függvényében (M: marker, NP: nem terhes), (alul) endogén kontroll Gliceraldehid-3-foszát dehidrogenázt (GAPDH) [37kDa].



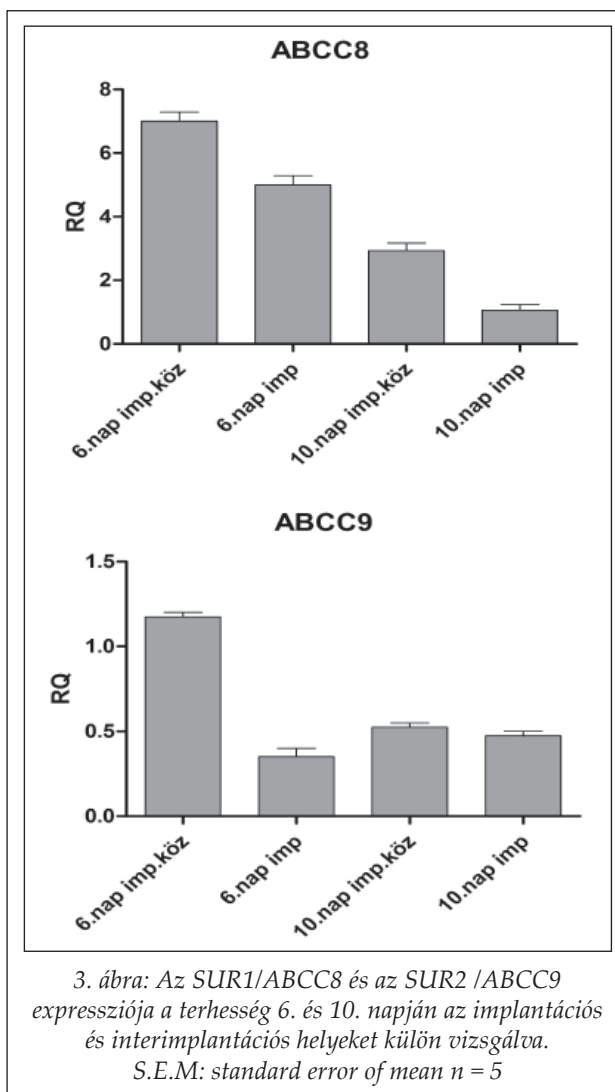
Eredmények

Real-Time PCR és Western blot analízis

A Real-Time PCR és Western blot analízis igazolta, hogy mindkét SUR alegység kimutatható a nem terhes és a terhes patkány uterusban. A SUR1 esetén mind az mRNS és a fehérje szintje drámaian megemelkedett a terhesség elején (6. nap) majd csökkent a 8. naptól a 12. napig és utána változatlan maradt a terhesség végéig (1. ábra). A SUR2 esetén nem tapasztaltunk számottevő változást a terhesség folyamán (2. ábra). A SUR1 esetén tapasztalt markáns emelkedés kapcsán a 6. illetve a 10. terhességi napokon az implantációs és az interimplantációs helyeket külön gyűjtve is megvizsgáltuk mindkét SUR alegység kapcsán (3. ábra).

A nem szelektív SUR agonista diazoxid uterus relaxáló hatása

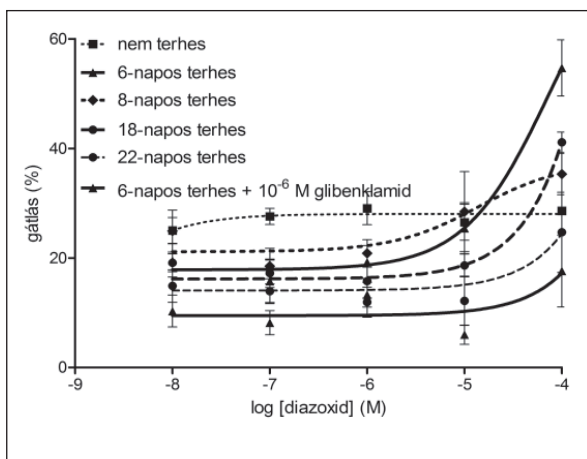
A diazoxid uterus-relaxáló hatását oxytocin indukálta kontrakciókon vizsgáltuk nem terhes valamint 6, 8, 18 és 22 napos terhes uterusokon 10^{-8} - 10^{-4} M dózistartományban. A diazoxid kontrakció gátló hatása a terhesség 6. napján volt a legerősebb



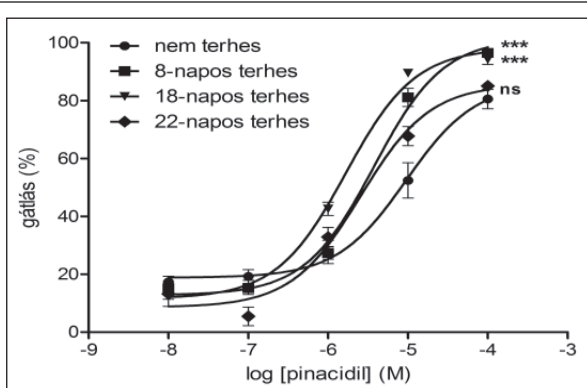
(60%), majd a 8. és 18 napon csökkent (40%). Azonban hatástalannak bizonyult a nem terhes valamint a 22 napos terhes uteruson. A terhesség 6. napján tapasztalt kontrakció gátló hatást 10^{-6} M glibenklamiddel blokkolni tudtuk (4. ábra).

A SUR2 szelektív agonista pinacidil uterus relaxáló hatása

A pinacidil (10^{-8} - 10^{-4} M) dóziszfüggően gátolta az oxytocin indukálta kontrakciókat a nem terhes valamint 8, 18 és 22 napon terhes uteruson (5. ábra). Az EC_{50} értékeket tekintve hatása kifejezettebb volt a terhes uterusokon a nem terheshez viszonyítva (6. ábra). Azonban az E_{max} értékeket tekintve a terhesség 8. és 18. napján volt a leghatásosabb, míg a 22. napon a nem terheshez hasonló értéket tapasztaltunk (5. ábra). A pinacidil uterus-relaxáló hatása a terhesség 8. illetve 22. napján blokkolható volt 10^{-6} M glibenklamiddel (7. ábra). Az EFS indu-



4. ábra: A nem szelektív SUR agonista diazoxid (10^{-8} – 10^{-4} M) kontrakció gátló hatása oxytocin (10^{-6} M) stimulálta kontrakciókra a nem terhes és a terhesség 6., 8., 18., és 22. napján, valamint glibenklamid (10^{-6} M) jelenlétében a terhesség 6. napján. S.E.M: standard error of mean, $n = 6$

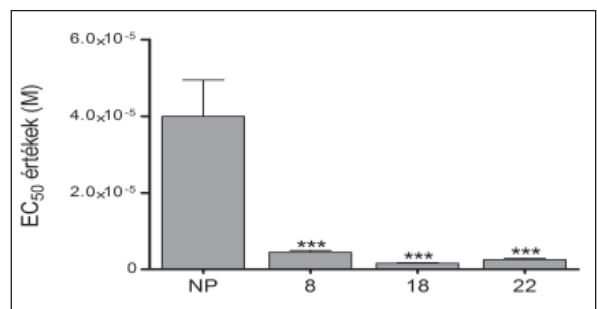


5. ábra: A SUR2 szelektív pinacidil (10^{-8} – 10^{-4} M) kontrakció gátló hatása izolált uterus gyűrűn (10^{-6} M) oxytocinnal indukált kontrakciókra a nem terhes, 8, 18 és 22 napos terhes patkány uterusán. Az E_{max} értékek statisztikai összehasonlítást a nem terhes állapotban kapott értékekhez viszonyítva tüntettük fel; ns: nem szignifikáns, ***: $p < 0.001$. S.E.M: standard error of mean, $n = 6$.

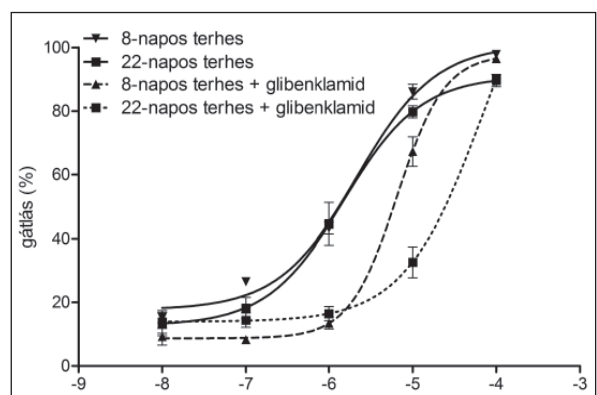
kálta kontrakciókat a pinacidil szintén dóziszfüggően gátolta, míg 10^{-3} M TEA jelenlétében a dózis-hatás görbék szignifikánsan jobbra tolódtak (8. ábra).

Az eredmények értékelése, következtetések

A terhesség során végbemenő folyamatok eredményeként az uterus struktúrája drámai változáson megy keresztül. A terhesség végén, a fájástevékenység beindulásáig, a miometrium kontraktilitása enyhén fokozódik, majd szüléskor ugrásszerűen megnő. A K_{ATP} -csatornák nyitásával az uterus kontraktilitása csökkenthető, így olyan vegyületek melyek K_{ATP} -csatornákat nyitnak fontos sze-

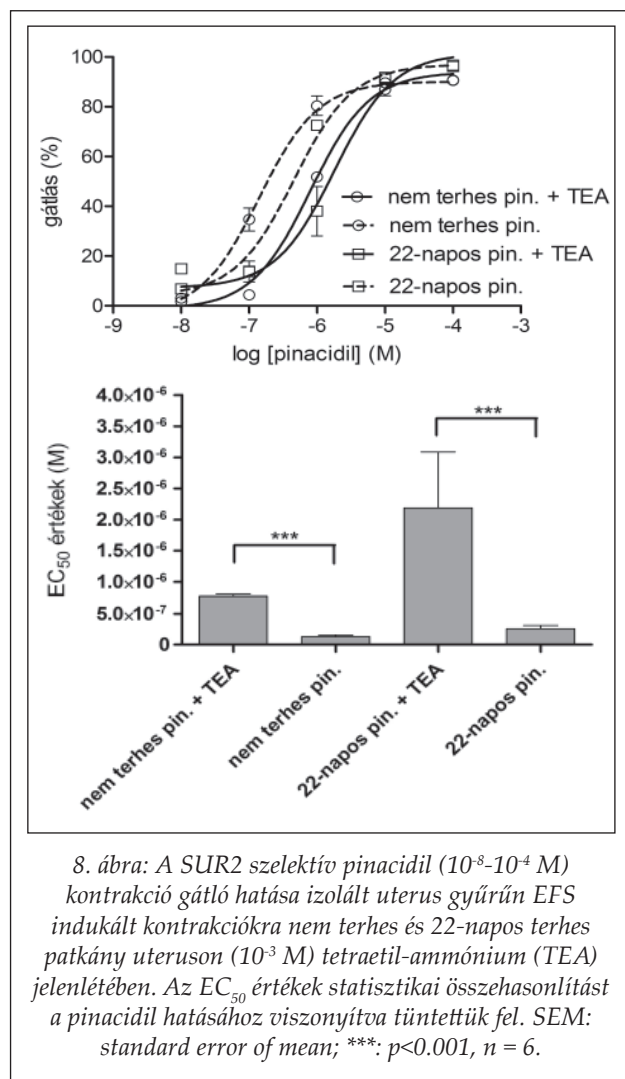


6. ábra: A SUR2 szelektív pinacidil (10^{-8} – 10^{-4} M) uterusra gyakorolt relaxáló hatásának EC_{50} értékei (10^{-6} M) oxytocin jelenlétében nem terhes (NP), 8, 18 és 22 napos terhes patkány uterusán. A statisztikai összehasonlítást a nem terhes állapotban kapott értékekhez viszonyítva tüntettük fel. S.E.M: standard error of mean; ***: $p < 0.001$, $n = 6$.



7. ábra: A SUR2 szelektív pinacidil (10^{-8} – 10^{-4} M) kontrakció gátló hatása izolált uterus gyűrűn (10^{-6} M) oxytocinnal indukált kontrakciókra 8 és 22 napos terhes patkány uterusán (10^{-6} M) glibenklamid jelenlétében. S.E.M: standard error of mean, $n = 6$.

repet játszanak a korai fájástevékenység és koraszülés megakadályozásának terápiájában [12]. A K_{ATP} -csatornák felépítésében szerepet játszó ABC transzporterek (ABCC8/SUR1 és ABCC9/SUR2) alapvetően meghatározzák a csatorna farmakológiai tulajdonságait. Mivel a K_{ATP} -csatornák felépítése nem egységes, így elengedhetetlen ismernünk az uterusban lévő K_{ATP} -csatornák felépítését. Korábbi közlemények azt igazolták, hogy SUR2B alegység található a patkány uterusban [13, 14]. Curley és mtsai [15], SUR1 és SUR2 mRNS izoláltak a humán miometriumban. A mi eredményeink azt igazolják, hogy mindkét alegység expresszálódik a patkány uterusban a terhesség folyamán és a SUR1 esetén karakterisztikus változás mutatható ki. Hasonlóan Curley és mtsai eredményeihez [15], mi is SUR1 csökkenést tapasztaltunk a terhesség végéhez közeledve. Feltehetően a SUR1



csökkenése illetve eltűnése az uterus kontraktilitásának fokozódását facilitálhatja.

A KCO (diazoxid és pinacidil) jelentős uterus-relaxáló hatással bírnak, mely hatás kivédhető glibenklamid adásával. A diazoxid nem szelektív SUR agonistaként míg a pinacidil SUR2 szelektív agonistaként képes hatni a K_{ATP} -csatornákon. A diazoxid hatása szoros összefüggést mutat a SUR1 expressziójának változásával, mivel a legerősebb diazoxid hatást akkor találtuk, amikor a SUR1 expresszió legmagasabb volt. Az is megerősítésre került, hogy az extrém magas SUR1 expresszió a terhesség 6. napján nem a vaszkularizációnak betudható, mivel az implantációs és interimplantációs helyeket külön vizsgálva nem tapasztaltunk jelentős különbséget sem SUR1 sem a SUR2 expressziója között. A SUR2 kapcsán nem tapasztaltunk olyan szintű változást, mint a SUR1 esetén, de a SUR2 szelektív pinacidil meglepően erőteljes uterus-relaxáló hatással bírt a terhesség bármely

időszakában. A glibenklamidral történő vizsgálatok a 8. illetve a 22. napon sem hoztak választ kérdésünkre, hogy mitől ilyen erős a pinacidil hatása. A glibenklamid blokkoló hatásában különbség mutatkozott a 8. és 22. napon, de ennek az okát magyarázni nem tudjuk. Azonban a TEA-val végzett kísérletek bebizonyították, hogy a pinacidil feltehetően nemcsak a K_{ATP} -csatornákon keresztül hat, hanem TEA szenzitív K^{+} csatornák is involválva vannak a hatásában. Hasonlóan Bukarica és mtsai (2011) [16] humán artérián kapott eredményeihez, a pinacidil hatása a mi vizsgálataink során is gátlható volt TEA-val. Így feltehetően, a humán artérián, úgy patkány uterusban is a pinacidil K_{ATP} -csatornákhöz való szelektivitása megkérdőjelezhető, amint azt mindkét esetben a TEA-val végzett kísérletek bizonyították.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mindkét SUR alegység kimutatható a patkány uterusban terhesség alatt. A K_{ATP} -csatornák SUR alegységei felelősek a csatorna farmakológiai reaktivitásáért. A SUR nem szelektív diazoxid uterus-relaxáló hatása akkor a legerősebb, amikor a SUR1 expressziója a legmagasabb. A SUR1 down-regulációja feltehetően elősegíti az uterus kontraktilitásának fokozódását a terhesség végéhez közeledve. A SUR2 szelektív pinacidil uterus-relaxáló hatása a terhesség bármely szakaszában vizsgálva erőteljesnek bizonyult, mely hatásban feltehetően nemcsak K_{ATP} -csatornák, hanem TEA szenzitív K^{+} csatornák is involválva vannak. Eredményeink alapján, a közeljövőben egy uterus szelektív "pinacidil szerű" K_{ATP} -csatorna opener kifejlesztése indokolt lehet, a koraszülés és korai fájástevékenység megakadályozásának terápiájában.

IRODALOM

1. Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G.: J. Lipid. Res. 42(7), 1007-17 (2001).
2. Brainard, A.M., Korovkina, V.P., England, S.K.: Semin. Cell. Dev. Biol. 18(3), 332-9 (2007).
3. Bryan, J., Vila-Carriles, W.H., Zhao, G., Babenko, A.P., Aguilar-Bryan, L.: Diab. 53 Suppl 3, S104-12 (2004).
4. Teramoto, N.: J. Physiol. 1, 572(Pt 3) 617-24 (2006).
5. Ko, E.A., Han, J., Jung, I.D., Park, W.S.: J Smooth Muscle Res. 44(2), 65-81. (2008).
6. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P. 4th, Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J.: Science. 17; 270(5239), 1166-70 (1995).
7. Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P., Wang, C.Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., Seino, S.: Neuron. 16(5), 1011-17 (1996).
8. Yamada, M., Isomoto, S., Matsumoto, S., Kondo, C., Shindo, T., Horio, Y., Kurachi, Y.: J Physiol. 15;499 (Pt 3) 715-20 (1997).
9. Novakovic, R., Milovanovic, S., Protic, D., Djokic, J., Heinle,

- H, Gojkovic-Bukarica, L.*: Basic Clin Pharmacol Toxicol. 101(3) 181-16 (2007).
10. *Babenko, A.P., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J.*: Circ. Res. 83(11), 1132-43 (1998).
11. *Gribble, F.M., Tucker, S.J., Seino, S., Ashcroft, F.M.*: Diab. 47(9), 1412-18 (1998).
12. *Piper, I., Minshall, E., Downing, S.J., Hollingsworth, M., Sadraei, H.*: Br. J. Pharmacol. 101(4), 901-17 (1990).
13. *Chien, E.K., Zhang, Y., Furuta, H., Hara, M.*: Am. J. Obstet. Gynecol. 180(5), 1121-26 (1999).
14. *Sawada, K., Morishige, K., Hashimoto, K., Tasaka, K., Kurachi, H., Murata, Y., Kurachi, Y.*: Eur. J. Obstet. Gyn. R. B. 122(1), 49-56 (2005).
15. *Curley, M., Cairns, M.T., Friel, A.M., McMeel, O.M., Morrison, J.J., Smith, T.J.*: Mol. Hum. Reprod. 8(10), 941-45 (2002).
16. *Gojkovic-Bukarica, L., Savic, N., Peric, M., Markovic-Lipkovski, J., Cirovic, S., Kanjuh, V., Cvejic, J., Atanackovic, M., Lesic, A., Bumbasirevic, M., Heinle, H.*: Eur. J. Pharmacol. 654(3), 266-73 (2011).

Érkezett: 2011. június 27.

Gyógyszerhatóanyag-kristályosodás valós idejű vizsgálata és módosítása segédanyaggal

PATAKI HAJNALKA*, PALÁSTI KATALIN, VAJNA BALÁZS,
CSONTOS ISTVÁN, MAROSI GYÖRGY

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia és Technológia Tanszék, 1111 Budapest, Budafoki út 8.
Levelezési cím: patakiahajni@gmail.com

Summary

Pataki, H., Palásti, K., Vajna, B., Csontos, I., Marosi, Gy.: *Real-time monitoring of drug crystallization with and without additives*

Crystallization processes can be evaluated from both kinetic and thermodynamic point of view with real-time analytical methods, effects of production parameters on the final quality can be estimated as well. Consequently there is an increasing emphasis on analytical devices being applicable for real-time detection. Among these techniques Raman spectrometry is advantageously utilizable for real-time monitoring of crystallizations. Impurities can dramatically change the nucleation and crystal growth, thus they can alter the physical and chemical properties of the final product. The use of different additives (polymers; surface active ingredients) in the crystallization step in order to modify the product morphology methodically is a new direction in the scientific literature. This study provides an overview of crystallization processes in the presence of additives as well as a summary concerning the monitoring of the drug crystallizations by real-time Raman spectrometry. Furthermore the effect of polyvinyl-pyrrolidone was examined in the course of cooling crystallization of Donepezil HCl, while the process was monitored by in-line Raman spectrometry.

Keywords: drug crystallization, real-time Raman spectrometry, additives

Összefoglaló

A kristályosítások valós idejű megfigyelésével tanulmányozható a folyamatok kinetikai, termodinamikai háttere, így a megfelelő kristályosítási paraméterek megtalálása mellett biztosítható a robosztus gyártástechnológia és az állandó termékminőség. Ebből adódóan az utóbbi években egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a valós idejű detektálásra alkalmas analitikai vizsgálati eszközök, melyek közül a Raman spektrometria előnyösen alkalmazható kristályosítások nyomon követésére. A szakirodalomból jól ismert, hogy a kristályosítás során jelen lévő szennyezések drasztikusan módosíthatják a göcképződést, kristálynövekedést, valamint a szemcsék fizikai, kémiai tulajdonságait. Új irányként jelenik meg viszont a hatóanyag-morfológia tervező és kedvező irányú befolyásolása különféle – gyógyszer technológiában használatos – segédanyagok alkalmazásával a kristályosítási technológia során. Jelen közlemény bővebb irodalmi áttekintést ad ezen segédanyagok jelenlétében végzett kristályosításokról, továbbá a kristályosítási folyamatok valós idejű Raman spektrometriás monitorozásáról. A polivinil-pirrolidon segédanyag hatását in-line Raman spektrometriás nyomon követéssel Donepezil hatóanyag hűtési kristályosításában követtük nyomon, feltérképezve a polimer folyamat- és termékmódosító hatását.

Kulcsszavak: gyógyszerhatóanyag kristályosítás, valós idejű Raman spektrometria, segédanyagok

Bevezetés

A szilárd hatóanyagok több mint 80%-át állítják elő oldatból történő szilárd anyag kiválasztással, ami csaknem minden esetben kristályosítást jelent. A kristályosítás, mint gyógyszeripari eljárás egyrészt a hatóanyag elválasztási és tisztítási lépéseként fontos, másrészt a kristályosítás körülményeinek megválasztásával a végtermék kristályszerkezete, szemcsemérete, szemcseméret eloszlása (CSD: *crystal size distribution*) alakja (habitus) is befolyásolható. Egy anyag eltérő kristályszerkezetű módosulatainak – polimorfjainak – azonosítása a gyógyszerfejlesztés korai fázisában nélkülözhetetlen, hiszen a hatóanyag morfológiai változása módosíthatja a fizikai és kémiai stabilitást, oldhatóságot és sok esetben a biológiai hasznosulást [1].

Ugyanazon kémiai szerkezetű anyag különböző kristálmódosulatai önálló hatóanyagként minősülhetnek, így egy originális gyógyszer esetében kiemelkedő fontosságú az összes polimorf módosulat feltárása és szabadalmi oltalma. Egy nem várt polimorf megjelenése a kristályosítás során, vagy egy esetleges polimorf átalakulás a tárolás, szilárd gyógyszerforma kialakítás alkalmával, veszélyezteti a termék minőséget. A generikus gyógyszergyárak kiélezett versenyében a gyártási (s ezen belül a kristályosítási) technológia fejlesztése szintén kritikus tényezővé vált, hiszen a generikus készítmények originális megfelelőiknél jóval alacsonyabb ára költségkímélő gyártástechnológiát igényel.

A kristályosítás körülményei által meghatározott kristályszerkezeten túl a szemcseméret, szem-

cseméret eloszlás, kristály habitus módosításával, a szűrhetőség, az adagolhatóság (folyási jellemzők), a préselhetőség azaz a technológia hatékonyságát meghatározó tényezők befolyásolhatók. Az a szemlélet, miszerint a kristályosított termék nem megfelelő tulajdonságait (szemcseméret, alak, felületi jellemzők, préselhetőség) aprítással, segédanyagok felhasználásával kell korrigálni egyre inkább a múlté. Az aprítás pl. gyógyszerhatóanyagok esetében azzal a veszéllyel járhat, hogy az aprítással bevitt mechanikai energia hatására kedvezőtlen irányú átalakulás (kémiai, ill. polimorf változás) következik be [2, 3]. Ezért napjainkban az a hatóanyag élvez piaci előnyt, mely a kristályosítást követően előkészítő műveletek nélkül, kevés segédanyag alkalmazása mellett közvetlenül feldolgozható. Ennek eredményeként erősödött meg az elmúlt években az a fejlesztési irány, amely állandó, megbízható minőségű termék gyártásának biztosítására a kristályosítási eljárások jobb kontrollálhatóságát tűzte ki céljául.

A kristályosítás alapvető paramétereinek változtatásán túl (oldószer, hőmérséklet-profil, oldatkoncentráció, keverési fordulatszám) a kialakult kristályok fizikai és kémiai sajátosságait különböző segédanyagok alkalmazásával is befolyásolni lehet. A szakirodalomban található példák polimerekkel, felületaktív anyagokkal, vagy a kristályosítandó anyaggal szerkezetileg hasonló komponensekkel együttes kristályosítási eljárásokra, ám ez a témakör a mai napig még kevésbé feltárt területnek tekinthető, s a fellépő kölcsönhatások értelmezésére javasolt mechanizmusok bizonyítékai sok esetben hiányoznak, vagy vitathatók.

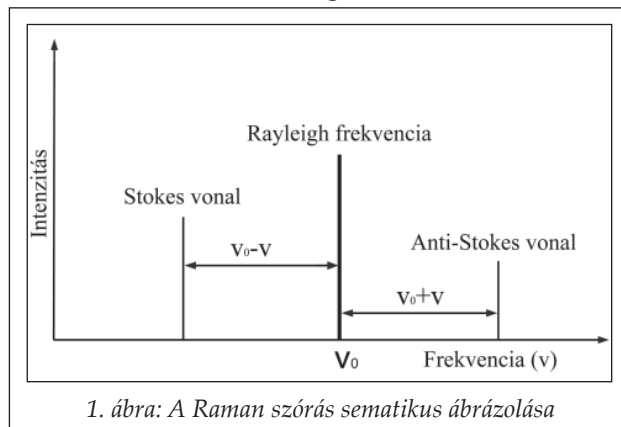
E közleményben főként Raman spektrometriával jól vizsgálható kristályosítási folyamatokban tárgyaljuk az egyes paraméterek (koncentráció, hőmérsékletprofil, keverési fordulatszám) hatását a termék tulajdonságaira. Valós idejű Raman spektrumok felvételével a folyamatok kinetikai és termodinamikai hátterének feltárására is sor kerülhet, ami alapját képezheti prediktív algoritmusokkal szabályozott ipari kristályosítási eljárások kidolgozásának. További perspektívára utalnak a különböző segédanyagok jelenlétében végzett kristályosítási eljárások, amelyek elemzése információt szolgáltat az egyes adalékanyagok hatóanyag módosító sajátosságairól.

A kísérleti eredmények ismertetése előtt a szakirodalmi hátteret a szokásosnál részletesebben mutatjuk be, mert számos újszerű vonatkozása miatt fontosnak tartjuk a téma széles körű megalkotását.

A Raman spektrometria elvének és alkalmazhatóságának rövid áttekintése

A Raman spektrometria az infravörös spektrometria komplementerének tekinthető, hiszen számos vibrációs átmenet, amely az infravörös spektrometriában inaktív, a Raman spektrometriában aktív és fordítva. Ebben az esetben nem a dipólusmomentumok változása okozza az energiefelvételt, hanem a kötések polarizálhatóságának változása. A mérés során egy monokromatikus fénynyalábot (ν_0) bocsátanak a mintára, ahol fényforrásként általában lézert alkalmaznak. A fény nagy része reflektálódik, míg egy kis része rugalmatlanul szóródik. A szóródott fényt egy spektrométerbe vezetve, nagy intenzitású, ún. Rayleigh vonal (rugalmasan visszaszórt foton) észlelhető a beeső fény frekvenciájának megfelelő frekvenciánál, de emellett frekvencia eltolódás is megfigyelhető, ezek a Raman sávok (rugalmatlanul visszaszórt foton). A Raman sávok nagyon kis intenzitásúak, (általában mintegy $10^{-8}\%$ -a a fényforráshoz képest) ezért észlelésük, kimutatásuk nehéz. A Rayleigh frekvenciánál kisebb frekvenciájúak az ún. Stokes vonalak, míg a magasabb frekvenciájú vonalak az anti-Stokes vonalak (1. ábra).

A Raman spektrometria hatékony eszköz polimorfia tanulmányozására, a sávarányok változásának vizsgálata alapján a polimorf módosulatok még kis koncentrációk esetében is viszonylag könnyen kimutathatók [4, 5]. Ez különösen akkor fontos, amikor a polimorf módosulatok megkülönböztetésére a röntgen-diffrakció (pl. kis koncentráció miatt) nem alkalmazható. A vizsgálat előnye, hogy a mintaelőkészítés nem jár mechanikai behatással, a vizsgálandó minta érintetlen marad. A vizsgálat mintagénye igen csekély, amely originális készítmény fejlesztése esetén lényeges szempont. Különböző mikroszkópos technikákkal kombinálva akár a nanogrammos skálán is dol-



1. ábra: A Raman szórás sematikus ábrázolása

gozhatunk. A Raman spektrometria alkalmazható vizes közegben végbemenő folyamatok tanulmányozására, továbbá üveg vagy műanyag felületen keresztül végzendő vizsgálatokhoz. További előny a kapott spektrumok egyszerű (NIR technikáknál könnyebb) kiértékelésében rejlik. Míg a NIR spektrometria kalibrációs modelljének felállítását alapos és pontos kísérleti munkának és többváltozós kalibrációs módszerek alkalmazásának kell megelőznie, addig a Raman spektrometria esetén a minőségi analízis az eltérő anyagokra jellemző karakterisztikus csúcsok segítségével is elvégezhető (a mennyiségi kiértékeléshez azonban ez esetben is szükség lehet kemometriai módszerekre).

A Raman spektrometria hatékonyságát – porlasztva szárított laktóz minták amorf és kristályos fázisának mennyiségi meghatározása során – összevetették a legtöbbször használt analitikai eljárásokkal, úgymint az XRPD, DSC, MTDSC (modulált hőmérsékletű kalorimetria), IMC-izoterm mikrokolorimetria, SC-oldat kalorimetria, GMS (gravimetrikus nedvesség szorpció vizsgálat) módszerekkel. A vizsgálat eredményeként a Raman spektrometria jó egyezést mutatott a legtöbb analitikai módszerrel (csupán a DSC-t találták kevésbé eredményesnek az amorf fázis kvantitatív meghatározására) [6].

A Raman spektrometria előnye számos más analitikai eljárással szemben az in-line alkalmazhatóság lehetősége. Ezáltal lehetséges az egyes folyamatok valós idejű megfigyelése, s azok kinetikai hátterének feltérképezése [7]. A kristályosítási eljárások termodinamikai és kinetikai jellemzőinek meghatározása a kristályosítás optimalizálását, végpontjának pontos megállapítását, a folyamat leghatékonyabb kivitelezését teszi lehetővé. A kristályosítások valós idejű detektálása tehát nemcsak a gyógyszerfejlesztés fázisában előnyös, hanem különösen fontos a termékgyártás során, amikor annak robusztusságát a gyors analízisen alapuló visszacsatolás biztosítja.

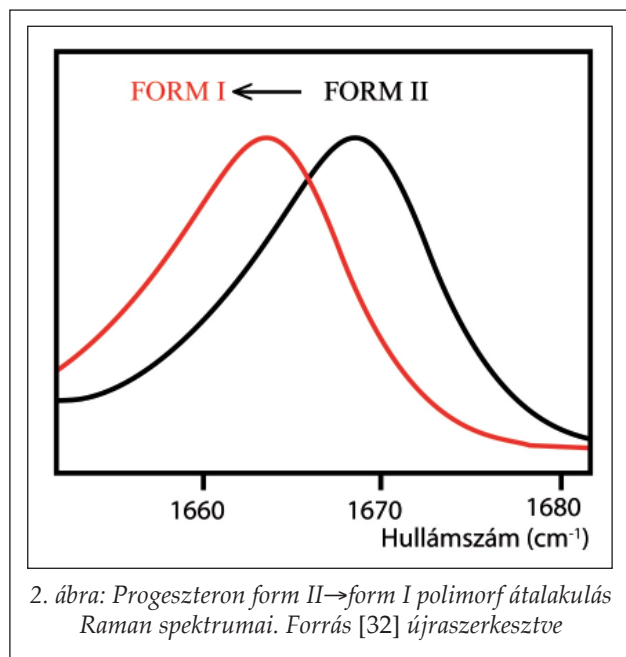
A Raman spektrometriás vizsgálatokkal összefüggő hátrányok, leküzdendő akadályok leggyakrabban kapcsolatosak a fluoreszcencia jelenségével, ami a gyenge Raman jeleket elfedve az erre hajlamos anyagok vizsgálatát akár meg is akadályozhatja. Bár a Raman szórt fotonok mennyisége az alkalmazott lézer frekvenciájának negyedik hatványával nő, ami a spektrumok kiértékelését megkönnyíti, a lézerfrekvencia és –teljesítmény megnövelésének – fókuszált lézernyaláb alkalmazása esetén – határt szab a vizsgálandó anyag stabilitása [8]. Ez a korlát egyes érzékeny gyógyszerható-

anyagok vizsgálata esetén akadályt jelenthet [9]. E korlátot nem fókuszált, ún. transzmissziós Raman berendezések alkalmazásával küszöbölik ki, amelyek akár rutin analitikai műveletként a gyártásba illesztett ellenőrzésként is alkalmazhatók [10].

A kristályosítási folyamat valós idejű vizsgálata

A kristályosítási folyamatok kontrolálása nehéz feladat, hiszen ezeknél az eljárásoknál a beavatkozási lehetőségek szabadsági foka igen csekély. A legalapvetőbb szabályozhatósági paraméterek a kristályosításban alkalmazott hűtési sebesség profil, az elegy keverésének intenzitása, vagy az oltókristályok minősége, mennyisége. Optimális hőmérséklet szabályzás révén kontrollálható pl. az oldat túltelítettsége, ezáltal befolyásolható a végső szemcseméret eloszlás. A kristályosítási eljárások szabályozási stratégiáinak kutatása során általában az optimális hőmérsékletprofil megtalálását, ill. az optimális oltókristály karakterisztikát (mennyiség, méret) tűzték ki célul [11, 12, 13, 14, 15, 16]. A szabályozási stratégia kutatásának egyik iránya olyan modellbázisú algoritmusok kifejlesztése, amelyek a folyamat matematikai modelljét használják a paraméterek várható alakulásának előrejelzésére. Az alacsony rendű lineáris modellek alkalmazása azonban a kristályosítási folyamatok szabályozásában a legtöbb esetben pontatlannak bizonyult, ezért újabban az ún. nemlineáris populáció egyensúlyon alapuló modellek bevezetését javasolták [17]. A kristályosítási folyamatok összetett jellegét megismerve az utóbbi időszakban olyan algoritmusok kutatását is megkezdték, melyek a fentiekben leírt hatásokat együttesen kezelve segítik az optimális terméktulajdonságok kialakítását [18].

A kristályosítási folyamatok valós idejű nyomon követése csak fejlett analitikai eszközökkel lehetséges, melyeket alkalmazhatunk akár a kiszűrt kristályok azonosítására, akár a folyamatok „real-time” nyomon követésére. A gyógyszerfejlesztés korai fázisában számos analitikai eszköz áll rendelkezésre az egyes polimorfok, vagy szolvátok azonosítására, ám ezek nem alkalmasak a folyamatok valós idejű elemzésére [19, 20]. Az iparban polimorfok azonosítására használatos analitikai eljárások – porröntgen diffrakció (XRPD), szilárd fázisú mágneses magrezonancia (ssNMR), differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) – esetében szükséges a minta előkészítés. Ennek során előfordulhat, hogy az oldószer elpárolgása mellett az eredeti kristályos forma is átalakul; ill. maga a mintavétel is „megzavarhatja” a rendszert, s nem



tudhatjuk, hogy az egészből kiragadott kis részlet milyen mértékben reprezentatív a teljes rendszerre. E probléma a szilárd fázis szuszpenzióban történő, valós idejű analízisével kerülhető el, amire az utóbbi években számos módszert fejlesztettek ki. Ilyen technika többek között a Fourier transzformációs infravörös spektrometria (FT-IR) [21, 22], a közeli infravörös spektrometria (NIR) [23], a fókuszált lézersugár reflexión alapuló vizsgálat (FBRM) [24, 25], az optikai mikroszkópos technika (PVM) [26], az akusztikus emissziós mérés technika (AES), az ultrahangos spektroszkópia (US), illetve a Raman spektrometria. A felsorolt technikák közül a Raman spektrometria a legalkalmasabb kristályformák gyors azonosítására. A ronsolásmentes Raman spektrometriás analízis segítségével a polimorf átalakulások kvantitatív kiértékelése is megvalósítható (ha a vizsgált anyag nem mutat fluoreszcenciát). A Raman spektrometria in-line alkalmazására azonban – különösen a kristályosítás területén – ezidáig kevés szakirodalmi példa áll rendelkezésre, így a módszer előnyei mellett számos kérdés még megválaszolatlan.

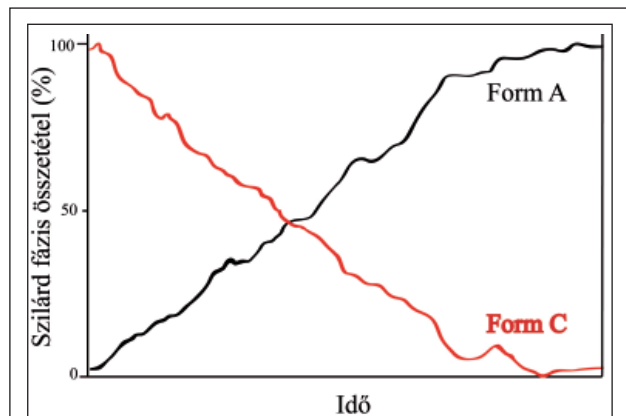
A Raman spektrometria egyik korai folyamatközel alkalmazása a lizozim koncentrációjának valós idejű meghatározása függő cseppes kristályosítás folyamatában [27]. A későbbiekben további függő cseppes kristályosítások valós idejű megfigyelése történt in-line Raman spektrometriás módszerrel aprotinin protein esetében ammónium-szulfát só jelenlétében [28, 29].

Több esetben elemezték oldószerben végbemelő polimorf átalakulásokat is in-line Raman mód-

szerrel, s meghatározták az átalakulási folyamatok hőmérséklet-, (oldószer)víz-tartalom- és lehűtési sebesség függését, továbbá kinetikai háttérét. O-amino-benzoészav esetén, pl. a hűtési kristályosítás, illetve az oldószer-közvetítéses átalakulási folyamat vizsgálatával határozták meg a form I, II, és III polimorf kapcsolatát, valamint kontrollált kristályosítási módszert dolgoztak ki a kívánt polimorf igény szerinti előállítására. A vizsgálatokat 25–65 °C közötti tartományban végezték víz-etanol oldószer keverékében, a hűtési kristályosítás során minden esetben form I polimorf jelent meg elsőként. Az elegyben lejátszódó oldószer közvetítéses polimorf átalakulásban 50 °C felett form I, míg 50 °C alatt form III polimorf látszott stabil formának. A form II kristálmódosulat a vizsgált hőmérséklet tartományban metastabil jeleget mutatott [30, 31].

A progeszteron nemi hormon két polimorfja (Form I, Form II) átkristályosítás során alakítható át egymásba, az átalakulási sebességet és annak hőmérsékletfüggését in-line Raman spektrumok segítségével állapították meg. A kalibrációs egyenest a Raman spektrumban megfigyelhető 1662–1667 cm⁻¹-es folyamatos csúcstolódásból határozták meg (2. ábra). Az 1662 cm⁻¹-nél megjelenő csúcs a form I, míg 1667 cm⁻¹-nél a form II polimorf- C=O vegyértékrezgésével azonosítható [32]. Az eredetileg magasabb hullámszámon megjelenő karbonil csoport vegyértékrezgésének eltolódása pedig a progeszteron 3-as helyzetű karbonil (C=O)-, és 4-es helyzetű C=C kettős-kötés konjugációja miatt következik be. A konjugáció a π elektronok delokalizációja miatt alakul ki, amely az eredeti kötési karakterisztikát is módosítja. Egy másik közleményben a progeszteron antiszolvens kristályosítása során az in-line Raman spektrumok kvantitatív kiértékelését PCA-főkomponens analízis segítségével végezték [33].

Egy – a Merck Kutató Laboratóriuma által kifejlesztett (MK-A jelzésű) – hatóanyag négy anhidrát, két hidrát és számtalan szolvát kapcsolatrendszerének tanulmányozásában szintén eredményesen alkalmazták az in-situ Raman mérési módszert. A kísérletek alapján meghatározták a hemihidrát→formC→formA polimorf átalakulás optimális hőmérsékletét (65 °C) és oldószerét (száraz izopropil acetát). Vizsgálták az átalakulási időket a hőmérséklet függvényében, a hemihidrát→formC átalakulás 15 °C-on 5,5 óra alatt, míg 10 °C-os (25 °C) hőmérséklet emelés hatására 1,5 óra alatt csaknem 100% formC polimorf volt jelen a szuszpenzióban (3. ábra). A formC→formA át-



3. ábra: MK-A form C \rightarrow form A oldószer közvetítéses polimorf átalakulás 35°C-on. Forrás [34] újraserkesztve

alakulás ezek után 35 °C-on mintegy 3,3 óra alatt vált teljessé. A Raman spektrumok kiértékelése PCA és MCR-többszörös görbe felbontás segítségével történt [34].

L-glutaminsav hűtéses kristályosítása során a polimorfok szuszpenzióban történő azonosítására alkalmazták az in-line Raman spektrometriát. A kalibrációs görbe felállítása a polimorfok (α , β form) különböző arányú mechanikai keverékeinek Raman spektrumával történt, melyet a kristálmódosulatok szuszpenzióban történő azonosítására eredményesen használtak. A kristályosítást 25 °C-on végezve minden esetben az α módosulat, vagyis a kinetikailag preferált termék vált ki, majd ezt követően melegítés hatására oldószer közvetítéses polimorf átalakulás játszódott le. Az átalakulás folyamán a kezdeti α változat teljes mennyisége a termodinamikailag stabilabb β polimorffá alakult. Mindemellett az átalakulás jelentős hőmérsékletfüggése is megfigyelhető volt [35]. A további vizsgálatok során az L-glutaminsav polimorf átalakulásának tanulmányozásában az elvégzett kísérleteket szimulációs eredményekkel kombinálva gyorsabb és olcsóbb eljárást fejlesztettek ki a legfontosabb kinetikai paraméterek megismerésére [36]. Végeztek olyan kristályosítási kísérleteket, ahol a képződött kristályok méretét, eloszlását és alakját FBRM, PVM segítségével határozták meg. A szuszpenzió oldat fázisának összetételét ATR-FTIR spektrométerrel, a szilárd fázist in-situ felvett Raman spektrumok alapján analizálták. A kísérleti eredmények értékelése mellett matematikai modellek felállításával igyekeztek a folyamatok kinetikai hátterét feltérképezni, a jövőbeni robosztus ipari eljárás kialakítása céljából [37]. Az L-glutaminsav termodinamikailag stabil β polimorfjának képződése magasabb túltelítettségű szintet igényel, mint a kinetikai α módosulaté, így ha a kristályosí-

tandó oldatban lokálisan túltelítettség alakul ki, a stabilabb β kristályszerkezetű termék válik ki. E lokális túltelítettség kialakulhat pl. reaktáns (kén-sav) adagolásának hatására (az oldatban jelenlévő L-glutaminsav nátrium sója protonálódva szabad savként válik ki), ha az oldat keverési intenzitása nem megfelelő. A kinetikai és termodinamikai kontroll szerint képződött termék arányát tehát a keverés intenzitása, a reaktáns adagolási sebessége és a reaktáns koncentrációja határozza meg [38].

A 2-[[3-(trifluorometil)fenil]amino]benzoesav kristályosításának in situ vizsgálata során szintén a hatóanyag polimorf átalakulásának tanulmányozására alkalmazták a Raman spektrometriát. A valós idejű spektrumokból mind a szuszpenzióban lévő szilárd, mind pedig az oldatfázis összetétele megállapítható volt. A kristályosításokat oltó kristályokkal és azok jelenléte nélkül egyaránt elvégezve, vizsgálták a folyamatok hőmérséklet- és időfüggését. Az in-line Raman kísérleti eredményekből elvégezhető volt az optimális kristályosítási körülmények meghatározása [39]. Egy másik esetben ugyanezen benzoesavszármazék enantiotróp polimorfjainak átalakulási hőmérsékletét határozták meg in-line Raman spektrometriával, s a szerzők szerint a technika más rendszerekre is alkalmazható [40].

A Taltirelin és Timepidium-bromid hatóanyagok oldószer-közvetítéses polimorf átalakulását figyelték 10% acetontartalmú vizes rendszerben, izoterm körülmények között, mindkét esetben az $\alpha \rightarrow \beta$ polimorf irányban valósult meg a folyamat. Az oltásos kristályosítás tanulmányozásakor a NIR spektrometria a víz közeli infravörös tartományban mutatott aktivitása miatt csak nagyobb koncentrációjú szuszpenziók esetén szolgáltatott kiértékelhető eredményt, ezért a folyamat valós idejű nyomon követésére a Raman spektrometria mutatkozott alkalmasabbnak. Az FBRM technikával a polimorf átalakulást csak abban az esetben tudták nyomon követni, ha a folyamat során a kristályok habitusában is változás következett be [41].

A citromsav anhidrát \rightarrow monohidrát fázis átalakulásának tanulmányozása során a szuszpenzióban izoterm körülmények között meghatározták a szilárd fázis mennyiségét, illetve annak összetételét. A kiértékelés során az oldat tömeg-egyensúlyát felhasználva számították a túltelítettség mértékét [42, 43]. A kristályosítási kísérleti eredményeket felhasználva első lépésben a gócképződés és -növekedés kinetikai paramétereinek felállítására került sor. E paraméterek felhasználásával alkotak egy ún. „sokaság egyensúlyi modellt” (PBE),

amely alapján már megadható a szemcseméret eloszlás (CSD) időbeli változása a citromsav monohidrát izoterm kristályosítása során [44, 45].

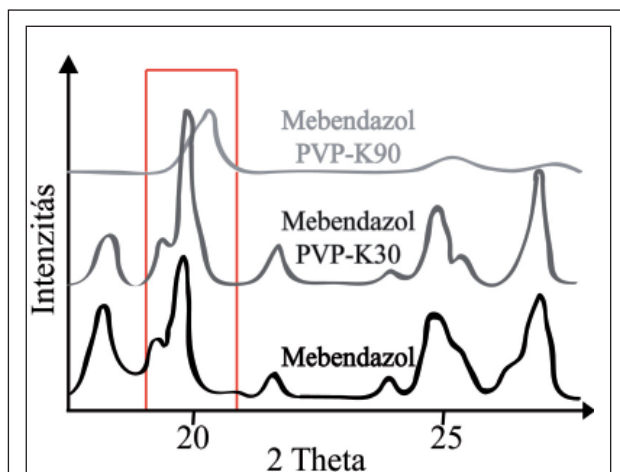
A karbamazepin antiepileptikum esetében a hatóanyag anhidrát(CBZA)→hidrát(CBZH) átalakulási sebesség meghatározására etanol-víz oldószerben végeztek in-situ Raman vizsgálatokat. A hidrát relatíve lassú kinetikájú kristályosodása miatt e forma kialakulása a sebességmeghatározó lépés. Azonos oldószer összetétel mellett (61 mol% etanol) az átalakulás alacsony hőmérsékleten gyorsabban játszódik le, amit a két forma oldhatósága közötti jelentős különbséggel magyaráznak az adott hőmérséklet-tartományban. Az anhidrát beoldódása alacsonyabb hőmérsékleten gyorsan bekövetkezik, így az oldatban a hidrát formára nézve nagymértékű túltelítettség alakul ki [46, 47]. Másik közleményben a szerzők beszámolnak a karbamazepin izoterm kristályosítás folyamán bekövetkező FormIII→FormI átalakulásáról, ahol az átalakulás jelentős hőmérsékletfüggését figyelték meg [48].

Kristályosítás segédanyagok jelenlétében

Jól ismert, hogy a kristályosítás alkalmával jelen lévő idegen anyagok alapvetően befolyásolhatják a kristálygóc képződés kinetikáját, a növekedés morfológiáját, s így akár a kialakult kristályok oldhatóságát is [49, 50]. Bizonyos esetekben olyan kristályalakok megjelenését is megfigyelték, melyek csupán segédanyaggal történő kristályosításnál jelentkeztek [51]. Némely szennyező komponens alapvetően elősegítheti a kristálynövekedést, mások csupán a folyamat gyorsaságát fokozhatják ill. csökkenthetik, ismét mások a kristályfelszínre gyakorolt szelektív hatásukkal a felület alakját változtatják meg [52].

A kristályosítás folyamatát befolyásoló komponensek lehetnek a kristályosítandó anyaggal szerkezetileg hasonló adalékanyagok [53, 54, 55], különböző polimerek [56] (pl. polivinil-pirrolidon, hidroxipropil-metilcellulóz, metilcellulóz, polietilén-glikol, polipropilén-glikol, polimetakrilsav származék), felületaktív anyagok (Tween 80:poliszorbát) [57, 58], alacsony molekulatömegű szerves és szervetlen komponensek [59], ill. fehérjeszerű anyagok egyaránt.

A polimerekkel gátolt kristályosításra a szakirodalomban számos példát találhatunk [60, 61, 62, 63, 64]. A mebendazol gyógyszerhatóanyag esetében polimer segédanyagokkal végzett kristályosítási eljárásban kis mennyiségű polimer (PVP) jelenlétét igazolták a végtermékben. A kristályos anyagról



4. ábra: Porróntgen diffraktogramok mebendazol PVP-vel történő kristályosításakor. Forrás [65] újraserkesztve

készült porróntgen diffraktogramokban – a nagyobb polimerizációs fokú PVP K90-nel végzett kristályosítás során – csúcsetelőadásokat figyeltek meg, ami az eredeti kristályszerkezet torzulására utal (4. ábra). Megfigyelték, hogy a végtermékben megtalálható néhány százaléknyi polimer a hatóanyag oldódási sebességét is megnövelte [65].

Oldószer közvetítéses polimorf átalakulás vizsgálatára felületaktív anyagok jelenlétében található példa a szakirodalomban. A polimorf átalakulási időt növelő hatás azonban eltér a különböző polimereknél tapasztaltaknál, hiszen ilyen esetekben a felületaktív anyag koncentráció függvényében az átalakulási idő nem egy konstans görbe szerint változik. Az adszorpció során a felület és az oldott tenzidmolekulák közötti kölcsönhatás következtében a kritikus micellaképződési koncentráció (CMC) alatti tartományban az egyedi tenzidionok felvételével párhuzamosan felületi aggregátumok, periodikus adszorptívum szerkezetek (hemimicella) is kialakulnak a határfelületen [66]. (A felületi hemimicella koncentráció {HMC} az a koncentráció határérték, ahol a felületi aggregátumok megjelenése kimutatható.) A kritikus micellaképződési koncentráció (CMC) elérését vizsgálva tehát az átalakulási sebességkoefficiens lépcsőzetes csökkenése tapasztalható. Ezzel magyarázható, hogy L-glutaminsav $\beta \rightarrow \alpha$ polimorf átalakulása során az átalakulási sebességkoefficiens alacsony tenzid koncentrációnál meredek görbe szerint csökken a monomolekuláris határfelületi réteg folyamatos kialakulása miatt. A felületi hemimicella koncentráció (HMC) elérésekor következik egy stagnáló szakasz egészen a CMC eléréséig, amikor is a felületaktív molekulák összekapcsolódásával lehet számolni. Ebben a szakaszban a felületi kötő-

1. táblázat

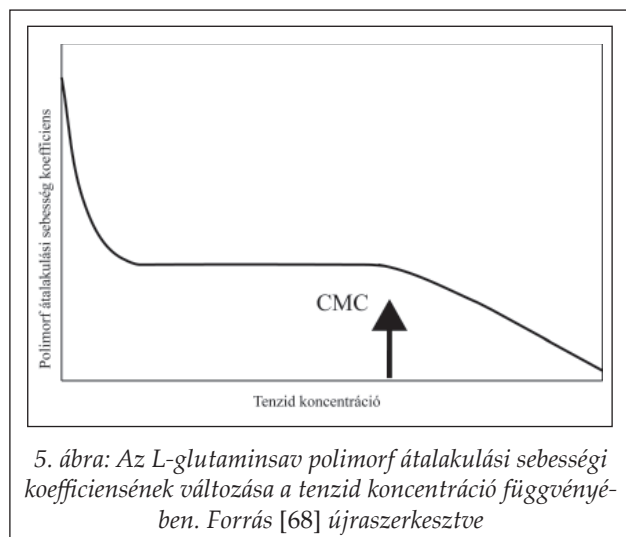
További példák polimer segédanyagok jelenlétében végzett kristályosításra

Gyógyszerhatóanyag	Felhasznált segédanyag	Tapasztalatok	Irodalmi hivatkozás
<i>Hidrokortizon acetát</i>	HPMC, MC, PVP, PEG 400,	HPMC esetén tapasztalták a legnagyobb morfológiai (kristályalak) változást; minden segédanyag esetében kristályosodást gátló hatást figyeltek meg	75
<i>Ibuprofen</i>	Metakrilsav származék (Eudragit)	Gömszerű kristályagglomerátumok kialakulása	52
	Hidrofil segédanyag (HPC, trihalóz, PVA, PVP, dextran, hidroxietil keményítő	Javuló folyási tulajdonságok, az oldhatóság növekedése, egyedi vagy rózsaszerű kristályaggregátumok kialakulása	
	Felületaktív anyagok PEG láncsal	Lapos, széles kristályok szemcseaggregáció kialakulása	
	Felületaktív anyagok PEG lánc nélkül	Lapos, széles kristályok jellegzetes háromszög alakú kristályvégek, egyedi vagy rózsaszerű kristályaggregátumok kialakulása	
<i>Klórpropánamid</i>	PEG, PVP, Poliszorbát 80	Rendkívül finom, apró kristályok képződése →oldhatóságnövekedés	59
RS-8359, MAO-A inhibitor	HPMC, HPC, PVP	Kristályosodást gátló hatás, oldódási sebesség növekedés	76
<i>Diflunisal</i> (nem szteroid gyulladáscsökkentő)	PEG 4000	A gyógyszer-polimer aránytól függően változó a polimorfia, az oldószer is hatással volt a polimorfiára	77
β -Sitosterol	Poliszorbát 80	Kis méretű kristályok előállítása	78
<i>Etil-p-hidroxi-benzoát</i>	polietilén-polipropilén glikol (Poloxamer 188)	Morfológiai és kristálméret változások	79
<i>Szulfatiazol, prednizon, klóramfenikol</i>	Poliszorbát 80	Megnövekedett oldódási sebesség	80
<i>Paracetamol</i>	PVP 2000, PVP 10000, PVP 50000	Nagyobb molekulatömegű PVP alkalmazásával közel szférikus kristályagglomerátumok	81, 82
<i>Salbutamol</i>	PVP K25, lecitin, HPMC, Span 85	PVP jelenlétében a túszerű kristályhabitus megváltozott, zömökebb tömszerű kristályok keletkeztek	83

helyek már telítettek, ezáltal a β forma beoldódása, s következésképpen az α módosulat megjelenése késleltetett. A CMC elérésekor az addig jellemző monomolekuláris réteg mechanizmust fölváltó multimolekuláris réteg adszorpciós mechanizmus kristálynövekedést gátló hatása jelentősebbé válik. Ezért a kritikus micellaképződési koncentrációnál nagyobb tenzid mennyiség hatására a polimorf átalakulási sebességekoefficiens értéke ismételtelen me-
redekebb görbe szerint csökken [67, 68] (5. ábra).

Az idegen anyagok jelenlétében történő kristályosítás leggyakrabban a hatóanyag kristály habitusában, azaz külső megjelenésében okoz változást, ám előfordulhat, hogy ilyen anyagok jelenlé-

tében módosul az adott anyag polimorf módosulata is. Eerre példa a celecoxib nevű nem szteroid alapú gyulladáscsökkentő, amely esetében a kristályosítás felületaktív anyag (Tween 80), ill. polimer (hidroxipropil-metil-cellulóz) jelenlétében egy addig még ismeretlen polimorf módosulat (Form IV) kialakulását eredményezte. Az új polimorf oldódási sebessége a termodinamikailag stabil kristálmódosulathoz (Form III) képest 2-szer nagyobbak adódott, s az előzetes stabilitás vizsgálatok alapján kémiai degradáció nem következett be. Az új polimorf képződése a kristályosításban alkalmazott segédanyagok arányától függően változott [69].



Segédanyag jelenlétében végzett kristályosítás esetében, valós idejű analízisről még kevés eredményt közöltek a szakirodalomban [70]. Ilyen példa a kalcium-karbonát kristályosítása, amelyet polimer segédanyagok jelenlétében (polikarboxisavak), in-line Raman spektrometriás analízist alkalmazva végeztek el és megállapították, hogy a keletkező polimorfok minőségileg és mennyiségileg is jól azonosíthatóak voltak. Az egyes részfolyamatok termékeinek valós idejű Raman spektrumokból elvégzett kvantitatív kiértékelése a porröntgen diffraktogramokból kapott (off-line) eredményekkel jó egyezést mutatott [71]. Olyan közleményeket is publikáltak, melyekben a segédanyagok módosító hatását tanulmányozták gyógyszerhatóanyagok anhidrát→hidrát átalakulására olyan esetekben, amikor a vizes közegű feldolgozás során számolni kellett a hidrát formába történő átalakulás lehetőségével. A vizsgálatok során a valós idejű Raman spektrumok alapján az átalakulás kinetikai hátterét tárták fel. A kísérleteket vizes közegben különböző segédanyagokkal elvégezve azt a tapasztalatot vonták le, hogy a polimorf átalakulás polimerek alkalmazásával befolyásolható. Karbamazepin jelenlétében pedig hidroxipropil-metilcellulózzal sikerült csökkenteni az átalakulási sebességét [72].

A karbamazepin nikotinamiddal történő kokristályosítását etanol oldószerben valós idejű Raman spektrometriás analízissel követték nyomon. A karbamazepint az adott körülményekhez tartozó oldhatósági értékéhez viszonyítva mintegy 50%-os feleslegben alkalmazták. Megállapították, hogy az átalakulás a nikotinamid koncentráció növelése esetén gyorsabban lejátsszódik le. (Míg 0,16 M nikotinamid összetételnél 3 óra kellett, addig 0,25

M-os összetétel esetén már 3 perc elegendő volt a teljes oldat közvetítéses átalakuláshoz.). Vízben végzett kísérletek során a karbamazepin anhidrát átalakulása karbamazepin-nikotinamid (CBZ-NCT) kokristállyá a hatóanyag dihidrát formájának megjelenésén keresztül játszódott le. Oldószerkelet alkalmazásával csapadékképzéses, ill. reaktív kokristályosítási kísérleteket is végeztek [73].

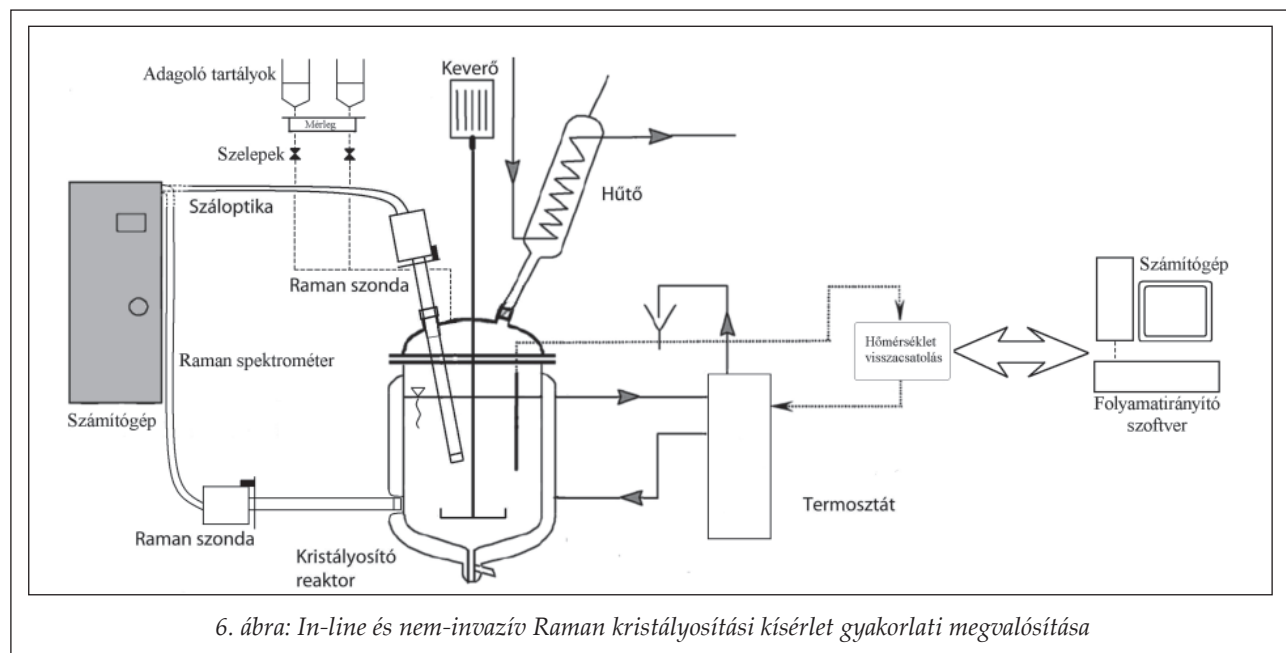
Az I. táblázatban néhány további közlemény fontosabb eredményei láthatóak a közelmúlt szakirodalmából [74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82].

Az előállított gyógyszerhatóanyag oldhatóságának, oldódási sebességének javítására sokszor a gyógyszerkészítmények előállításakor kerül sor, ahol különféle segédanyagokkal, esetenként új gyógyszerhordozó rendszer kialakításával érhető el a terápiás hatás. A gyógyszerkeletkezési lépések során a segédanyagok jelenlétében pedig feltehetően nem kívánt átalakulások – polimorfia változás, amorf hatóanyag kristályosodása – melyek korai megfigyelése döntő fontosságú a gyártástechnológia kidolgozásában. A különféle segédanyagok alkalmazásával, a hatóanyaggyártás utolsó fázisában – a kristályosításban – bizonyos terméktulajdonságok (polimorfia, szemcseméret, habitus) kedvező irányú módosítása mellett a fent említett hatóanyag-segédanyag kölcsönhatások is tanulmányozhatóak a későbbi, formulálási szakaszban bekövetkező átalakulások elkerülése érdekében. Ezen interakciók vizsgálatához érzékeny, szelektív, valós idejű detektálásra alkalmas fejlett analitikai eszközökre van szükség. A szakirodalmi áttekintésből következik, hogy a közleményekben tárgyalt jelenséget, azaz az idegen komponensek módosító hatását hatóanyagok kristályosodására kihasználva, a kristályosítás folyamata megfelelő segédanyagok alkalmazásával tervszerűen befolyásolható. Ezáltal a keletkezett anyag szemcsemérete, habitusa, sőt esetleg polimorfija is kedvező irányba módosítható. Ilyen irányú kutatómunka kezdeti lépéseit ismertetjük a következőkben, elsősorban analitikai és gyógyszerkeletkezési megközelítésből.

Anyagok és kísérleti módszerek

Anyagok

A kristályosítások Donepezil HCl (molekulatömeg 415,95 g/mol; Richter Gedeon NyRt.) és polivinilpirrolidon (PVP-K30, átlagos molekulatömeg 40000 g/mol; gyártó: Sigma Aldrich) felhasználásával történtek.



Kísérleti módszerek

Kristályosító berendezés

A kialakított kristályosító berendezésben a Raman spektrometria valós idejű detektálása száloptika alkalmazásával többféle kísérleti elrendezésben valósítható meg. Ezek a rendszert zavaró hatás mértékétől függően on-line, in-line és a nem-invazív eljárások közé sorolhatók. Az *on-line* eljárás alkalmával a rendszer vizsgálata egy a közegből elvezetett mintán történik, melyet ezt követően visszavezetünk a vizsgálandó elegybe, azaz a valós idejű spektrumok felvétele egy folyamatos cirkulációs kör segítségével történik. Ezzel szemben az *in-line* eljárások alkalmával nincs cirkuláltatás, a Raman szonda közvetlen oldatba merítésével válik lehetővé a spektrumok felvétele (6. ábra). A *nem-invazív* (nem behatoló) módszer esetén a vizsgálat a rendszer zavarása nélkül valósítható meg, mivel a spektrumok felvétele kívülről, a közeget határoló edényen keresztül történik, s így a detektálás során a szonda nem érintkezik a közeggel [83].

A folyamatirányított rendszer legfontosabb részei a reaktor (0,5 l-es in-line Raman mérésre alkalmas, ill. 100 ml-es nem-invazív vizsgálatokra alkalmazható duplafalú üvegreaktor → a reaktor egyik oldalán duplikálás nélküli), programozható termosztát a két reaktor hőmérsékletének egyidejű szabályzásához, változtatható fordulatszámú IKA típusú keverőmotor, a Yokogawa cég által gyártott Stardom folyamatirányító szoftver. A Stardom olyan applikációs szoftver csomagokkal

rendelkezik (APPF: Advanced Process ProtFolio), amely különböző ipari folyamatok irányítástechnikai megoldásait tartalmazza. Az autonóm szabályzó egyik típusát, az FCN (Field Control Node) moduláris szabályozót alkalmazzuk. Ez esetben a felhasználó választhatja ki a telepítendő modulokat attól függően, hogy milyen típusú jeleket kíván küldeni és fogadni a csatlakoztatott perifériás eszközöktől.

A hőmérsékletmérés Pt-100 hőfokérzékelőkkel történik, a rendszer további tartozékai a propell és anker keverők, a beadagoláshoz szükséges adagolótartályok ill. mérleg és szivattyú.

Kísérleti eljárások

Az in-line nyomon követett kristályosítások alkalmával minden esetben 20 cm³ desztillált vízhez hozzáadtunk 6,5 g Donepezil HCl sót, majd a szuszpenziót 50 °C-ig melegítettük, a keverési fordulatszám 200 rpm volt. A segédanyag kristályosításban az előzetesen vízben oldott polivinilpirrolidont felmelegítést követően adtuk a rendszerhez. Exponenciális csökkenő hűtési profil mellett az oldatokat szobahőmérsékletig hűtöttük. A képződött kristályokat szűrés után szobahőmérsékleten szárítottuk. A nem-invazív mérés technika alkalmazásakor oltásos, izoterm (31 °C) kristályosítást végeztünk 0,1%-nyi Form IV kristályszerkezetű oltókristályok segítségével. A végtermékek azonosítását Raman spektrometria, polarizációs fénymikroszkóp, pásztázó elektronmikroszkóp és differenciális pásztázó kalorimetria segítségével végeztük.

II. táblázat

Polivinil-pirrolidon hatása Donepezil kristályosításában

Donepezil:polivinil-pirrolidon tömegarány	Kristályosodási		$t_{\text{lehűlés}} - t_{\text{kiválás}}$ (óra)
	hőmérséklet (°C)	időtartam (óra)	
100:0	29	4	1,6
100:1	29	4,1	3,2
10:1	29	5,6	3,6
1:1	29	12,6	6,8

A valós idejű Raman spektrumok felvétele HORIBA Jobin Yvon Raman mikrospektrométerrel történt Nd-YAG (532 nm) frekvenciakettőzött lézer alkalmazásával, a spektrumfelvételi idő a vizsgálati körülmények függvényében változott, csakúgy mint a spektrumok akkumulációs száma. A folyamatok kiértékelése CLS (*classical least square*) módszerrel történt.

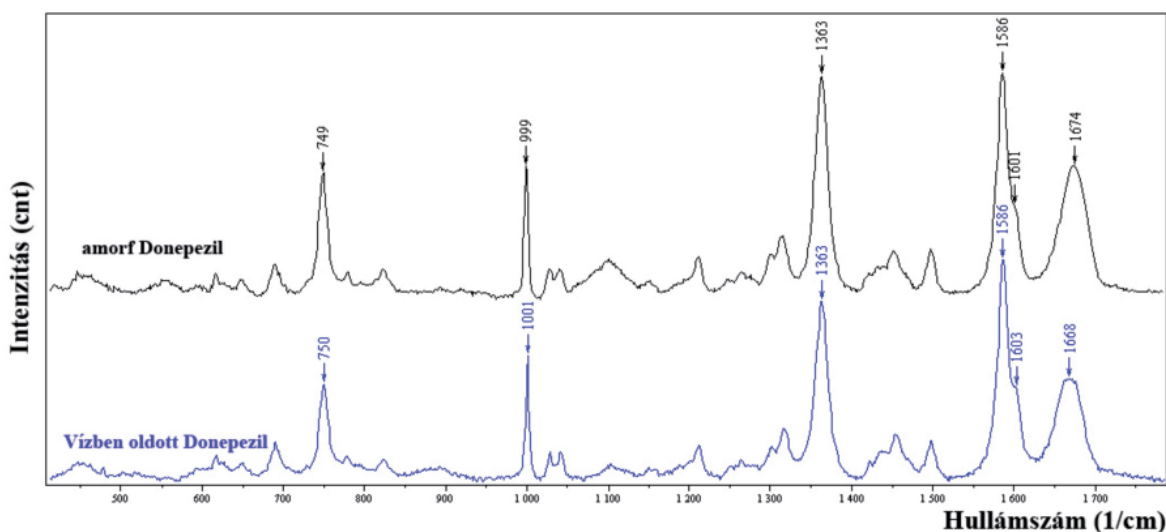
A mikroszkópos felvételek Carl Zeiss Jena polarizációs fénymikroszkóppal készültek, a SEM vizsgálatokat JEOL JSM-6380LA típusú elektronmikroszkóppal, míg a DSC felvételeket Setaram gyártmányú SC 92-es típusú készülékkel végeztük.

Eredmények és értékelésük

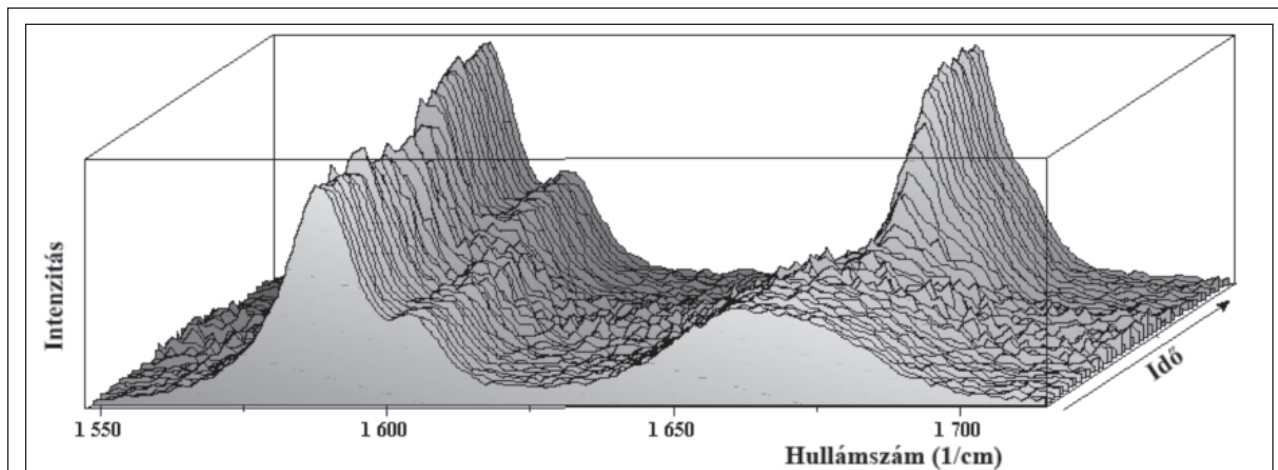
A tervezett vizsgálat alapvető feltétele a hatóanyag oldatának Raman aktivitástól függő detektálhatósága. A Donepezilt vízben feloldva, s Nd-YAG lézerrel vizsgálva, jól azonosítható Raman spektrumokat kaptunk, s a vízben oldott hatóanyag az amorf forma Raman spektrumával mu-

tatott legnagyobb hasonlóságot. A 7. ábrán feltüntetett spektrumok a hatóanyag amorf és vízben oldott állapotára vonatkoznak. Jelentős eltérés az 1631-1701 cm⁻¹ hullámszámtartományban tapasztalható, mindkét esetben megjelenő csúcs oldat esetében laposabb maximumában. Ez a Donepezil molekulában megtalálható C=O vegyértékrezgésének sávja, melynek maximuma a hatóanyag viz-es oldatában alacsonyabb hullámszámon jelentkezik. Ennek oka a Donepezil és vízmolekulák közötti H-kötés kialakulása, amely másodlagos kötésként – a kölcsönhatás intra-, vagy intermolekuláris jellegétől függetlenül –, Raman spektrum-beli hullámszám csökkenést okoz.

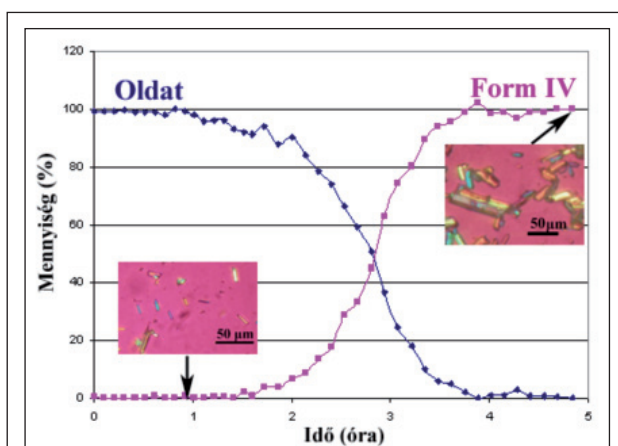
A Donepezil izoterm kristályosítása alkalmával a túltelített oldatból kivált szilárd termék az oltó-kristályok kristályszerkezetével azonos volt, a folyamat közbeni termékkiválás jól nyomon követhető a 8. ábrán feltüntetett Raman spektrumokból. Az oldott állapotú hatóanyag 1668 cm⁻¹-es laposabb csúcsának maximumát felváltja a IV-es formára jellemző 1671 cm⁻¹-es élesebb csúcs.



7. ábra: Amorf és vízben oldott Donepezil Raman spektruma

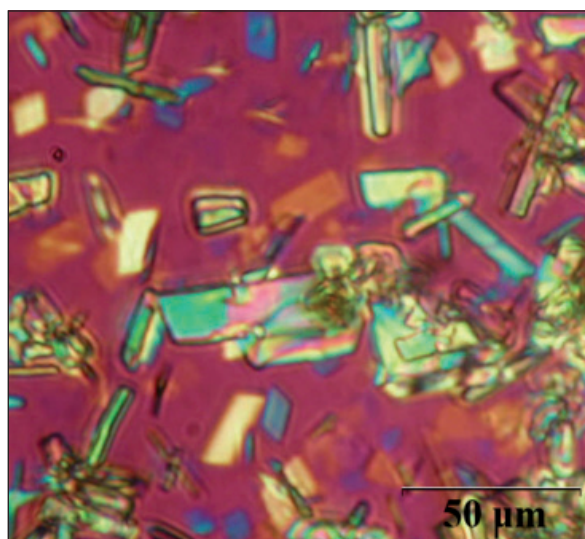
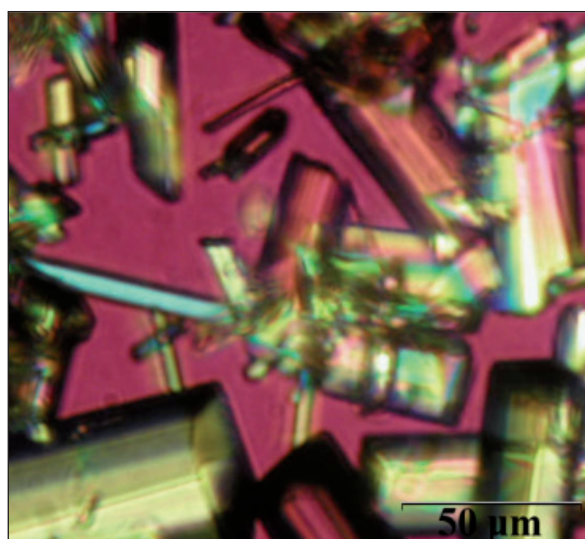


8. ábra: 3D-s Raman spektrum ábrázolás Donepezil kristályosításának nem invazív Raman spektrometriás nyomon követésekor

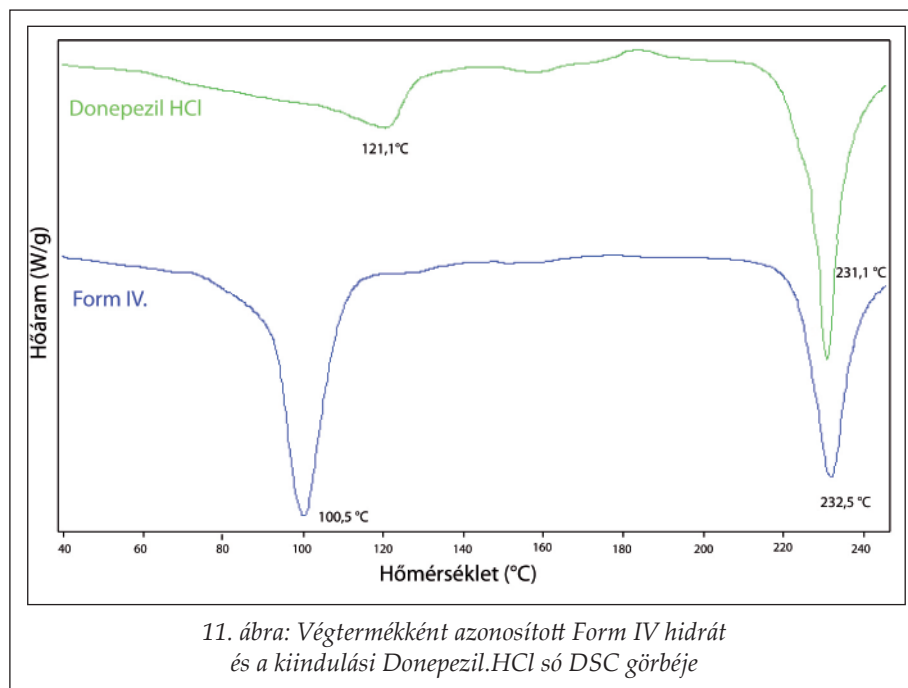


9. ábra: Donepezil kristályosítási folyamatának mennyiségi kiértékelése nem invazív módon felvett Raman spektrumokból

A valós idejű Raman spektrumokból mennyiségi kiértékelést készítve vizsgálhatóvá válik a kristályosítás kinetikai háttere, a folyamat végpontja megállapítható. A kristálykiválás az oltást követő negyedik óra elteltével vált teljessé, ugyanakkor megállapítható, hogy a szilárd fázis jelenléte a Raman spektrumokban csak bizonyos kristálméret és koncentráció felett igazolható. Így a képződött kristályok detektálása a kristályosítási körülményeken kívül nagymértékben függ az anyagi tulajdonságoktól is. Az oltás után egy órával már szemmel is látható, többségében apró méretű kristályok voltak jelen az oldatban (9. ábra). A különböző időpontokból származó kristályok alakja és méreteloszlása a keverés hatása miatt nem mutatott jelentős különbséget. Keverés nélkül, lassú oldószer elpárologtatás után a képződött kristályok viszont nagyobb méretű téglalatest alakúak (10. ábra).



10. ábra: Donepezil Form IV kristályok keverés nélküli, lassú és gyors oldószer elpárologtatás után



Donepezil kristályosításának in-line Raman spektrometriás vizsgálata

A hatóanyag hűtéses kristályosításában minden esetben a hidrátként azonosított IV-es forma vált ki, melyet a felvett DSC görbék is alátámasztottak [84] (11. ábra). A Donepezil:polivinil-pirrolidon = 1:1 arányú kristályosítása alkalmával a valós idejű Raman spektrumok kiértékelését nehezítette a fel-lépő fluoreszcencia jelensége, a spektrumok jel-zaj viszonya még nagyszámú akkumuláció mellett is kedvezőtlen volt. Így a kristályosodás megindulá-sának jelzése Raman spektrométerrel csak na-gyobb szilárd fázis koncentrációnál, a már látható-an opálos oldat kialakulásakor tapasztalható.

A segédanyagként felhasznált polivinil-pirrolidon jelentős mértékben lelassította a kristályosi-tás folyamatát (II. táblázat), ami feltehetőleg a ha-tóanyag és polimer molekulák között kialakuló H-hidas kölcsönhatásnak tulajdonítható. A poli-mert azonos mennyiségben alkalmazva a ható-anyaggal a göcképződés és a kristálynövekedés időtartama egyaránt jelentős mértékben növeke-dett. A képződött kristályok alakja nem, míg mé-reteloszlása nagyobb mennyiségű segédanyag je-lenlétében kiszélesedett, az agglomeráció mértéke megnőtt (12. ábra). A hatóanyag hidrát módosula-ta alakult ki jellemzően hosszúkás téglatest alakú kristályok formájában. A polimer segédanyagot a hatóanyaggal 1:1 arányban alkalmazva viszkozus rendszer jött létre, melyben a részecskék összetapa-dása a szűrés és szárítás folyamán jelentős volt.

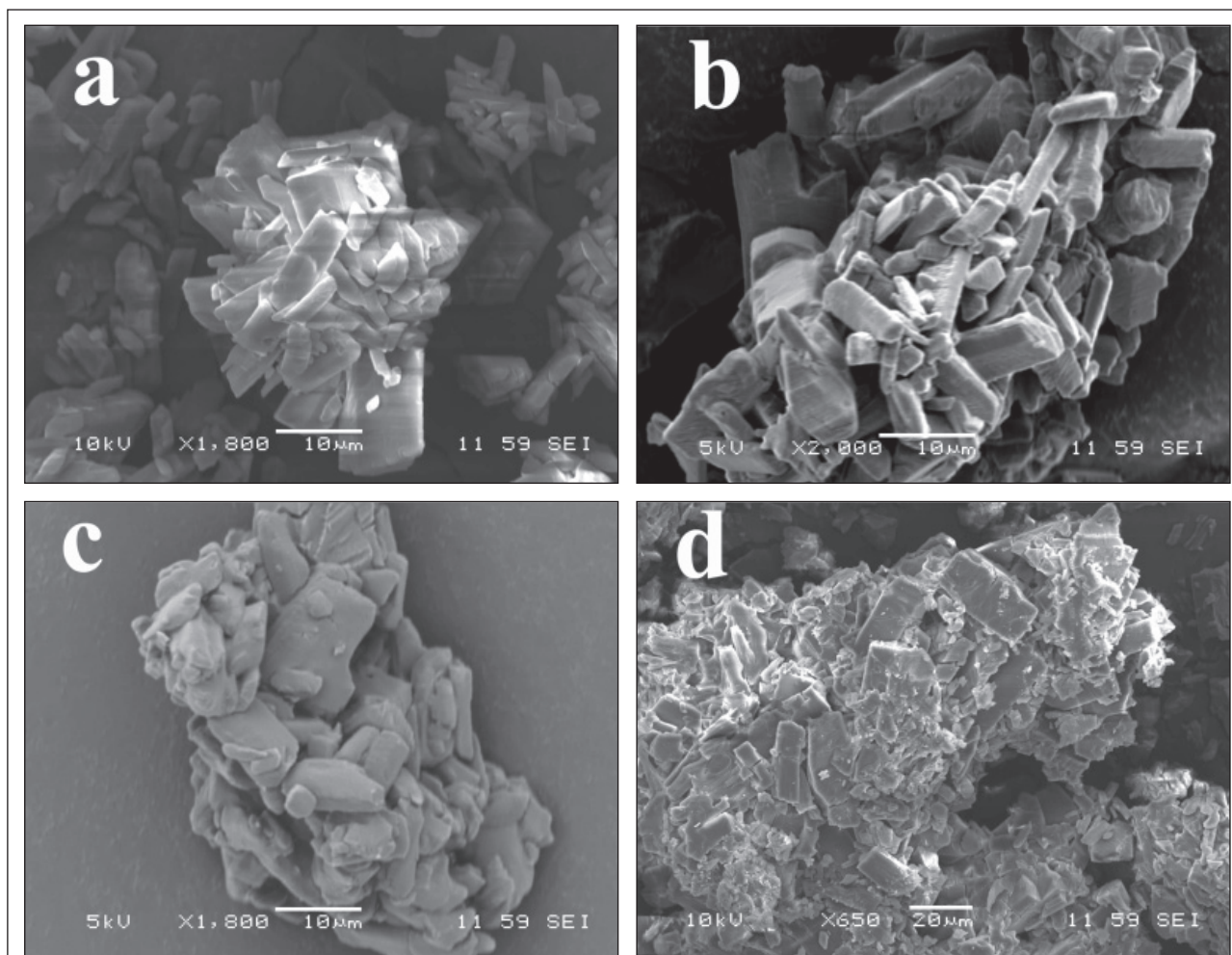
A segédanyagokkal vég-zett kristályosítások pontos mechanizmusa a szakiroda-lom alapján még vitatott. Így annak magyarázata is többféle közelítésből olvas-ható. A segédanyag alapve-tően a kristályosítás három főbb lépése során fejtheti ki a hatását:

1. tútelített oldat elkészíté-se, kialakulása;
2. stabil kristálygócok kiala-kulása;
3. kristálynövekedés.

A tútelített kristályosi-tandó oldatban a molekulák diffúzió útján mozognak, ütközésük során összekapcsolódnak, majd kristály-gócként kiválnak, ezt köve-

tően veszi kezdetét a növekedési fázis. Ha a diffú-zió elegendően gyors (pl. nagymértékű tútelített-ség esetén), a göcképződés nem diffúziókontrol-lált. Polimerekkel együtt történő kristályosítás viszont késleltetheti a kristálykiválást, módosít-hatja a kiváló kristályok alakját, oldhatóságát. A folyamat ez esetben is tapasztalt időbeli eltolódása magyarázható a polimer oldat tútelítetttségét csökkentő hatásával is [85]. A segédanyagokkal végzett kristályosítás során lejátszódó mechaniz-musok egyik lehetséges magyarázata a diffúzió-gátlás, melynek elsődleges következménye a kés-leltetett kristálykiválás. A donepezil polivinil-pirrolidon jelenlétében végzett kristályosítása al-kalmával elsődleges hatásként az időben késlelte-tett göcképződés továbbá kristálynövekedés volt tapasztalható, ami leginkább a polimer oldat túte-lítetttség csökkentő hatásával magyarázható. Ugyanazon körülmények mellett a kristálykiválás időben késleltetve következik be és a polimer mennyiségi növekedésének függvényében a teljes kristályosodás folyamata is hosszabban játszódik le.

A polimerek jelenlétében történő kristályosítás alkalmával azonban nemcsak a folyamat időbeli eltolódásával számolhatunk, hanem gyakori jelen-séggé válhat a kristályalak- és gyakran old-hatóság-változás. Egy korábbi megközelítés sze-rint a polimerek a kristálygócok felületét hálósze-rűen bevonva gátolják annak növekedését, így a lehetséges növekedési irányok korlátozottságától függő egyenetlen felszín kialakulása figyelhető



12. ábra: SEM felvételek Donepezil kristályokról a) segédanyag nélküli, b) 100:1 Donepezil-PVP arányú, c) 10:1 Donepezil-PVP arányú, d) 1:1 Donepezil-PVP arányú kristályosítás

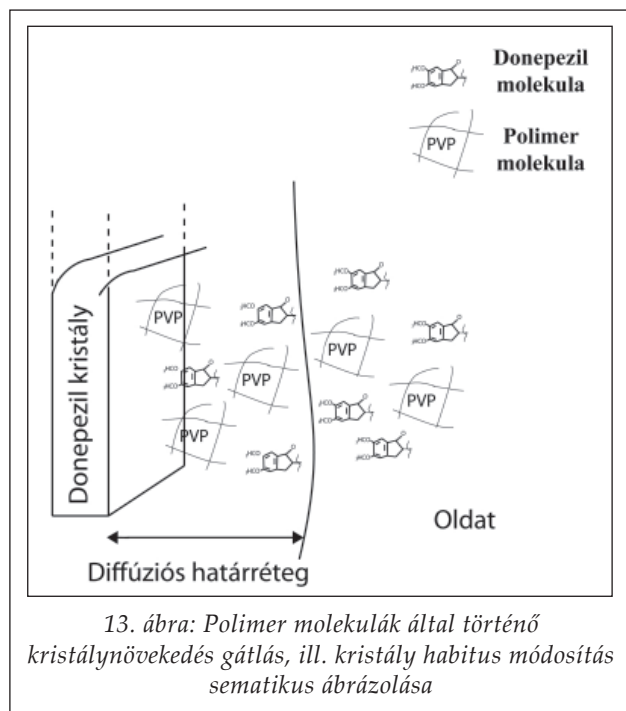
meg [86]. A polimer kristályfelszínre történő adszorpciójával is akadályozza további gyógyszer-molekulák beépülését a kristályrácsba, s ezáltal befolyásolja a kristályforma kifejlődését [87]. A kristályok felszínén megjelenő, s a keverés intenzitásától függő vastagságú hidrodinamikai határfelületi réteget a kristályfelület és polimer molekulák közötti másodrendű kötőerők stabilizálják [88]. A létrejött fázisréteg nem a kristálykiválást, hanem a növekedést csökkenti azáltal, hogy az oldatból diffúzióval kristályfelszínhez közeledő hatóanyag molekulák rácsba rendeződését gátoltja (13. ábra).

A növekedés gátlása a polimer molekulák méretétől, illetve a H akceptor és donor funkciók számától függ. Ha a segédanyag molekulák a kristály eltérő irányú részein hasonló mértékben kötődnek meg, csupán a kristálynövekedés gátolt, a morfológia nem változik. A kristály egyes felületein eltérő mennyiségben adszorbeálódott „szennyező”

molekulák azonban a hatóanyagkristály alakjában is változást indukálhatnak. Ha kristályok morfológiai változása fajlagos felületük növekedésével jár, akkor azzal arányosan (a nanométeres tartományban drasztikusan) javul az oldhatóság.

Az általunk vizsgált hatóanyag esetében a keverés hatására a segédanyag nélküli kristályosítás során is kis szemcseméretű ($\approx 10\mu\text{m}$), szabálytalan alakú kristályok keletkeztek. Emiatt az alkalmazott polimer kristályalakra gyakorolt esetleges hatása nehezen észlelhető, a SEM felvételek alapján habitusváltozás polivinil-pirrolidonnal egyértelműen nem igazolható.

A továbbiakban a segédanyag jelenlétében végzett kristályosítások pontos mechanizmusának tisztázására irányuló további kísérletek mellett érdekes lehet a Raman spektrumok visszacsatolásával történő szabályzás létrehozása, amely az FDA által előírányzott PAT technológia megvalósítását tűzi ki céljául.



Összefoglalás

A kristályosítási folyamatok valós idejű tanulmányozása kiemelt ipari jelentőségű feladat, amely a kinetikai és termodinamikai háttér megismerését és robosztus, jól szabályozható állandó termékminőséget biztosító gyártástechnológia kidolgozását teszi lehetővé.

A szakirodalomban a valós idejű Raman spektrometriás vizsgálatok alkalmazása gyógyszerhatóanyag polimorfok kapcsolatrendszerének feltárására még viszonylag kevésbé terjedt el. Segédanyagok jelenlétében végzett kristályosítás esetén végzett in-line Raman vizsgálatokról pedig csupán elvétve található eredmény.

A polivinil-pirrolidon jelenlétében végzett kristályosítások esetén tehát a felhasznált „adalék-komponens” a vizsgált esetekben a kristálykiválást időben késleltette. Nagyobb mennyiségű polimer jelenlétében a kristályosodás teljes időtartama is jelentős mértékben megnőtt. A hatóanyag-segédanyag azonos aránya mellett a donepezil teljes kiválása mintegy háromszor tovább tartott, mint a polimer alkalmazása nélküli esetben. (A keverés okozta kristály tördelődés miatt a polimer habitusmódosító hatása egyértelműen nem tűnik ki.)

A nem-invazív Raman vizsgálatok alkalmazásával a kristályosítás nyomon követése és kiértékelése sikeresen elvégezhető. Összehasonlítva az in-line és nem-invazív módon felvett hatóanyag oldatspektromát csupán intenzitásbeli különbség lépett fel, a

nem-invazív mérés esetén általánosságban kisebb intenzitás értékeket tapasztaltunk.

E munka eddigi eredményei alapján a kristályosítások időbeli lefutása nyomon követhető, a folyamatok kvalitatív kiértékelése elvégezhető. Azonban néhány kérdés a szakirodalomban továbbra sem tisztázott, melyek megválaszolása esetén a kontrolált kristályosítás szélesebb körű elterjedése várható. Nem könnyű pl. a dinamikus kristályosítások mennyiségi kiértékeléséhez szükséges kalibráció elkészítése, mivel számos paraméter (szilárd fázis koncentráció, termék szemcseméret, hűtési hőmérséklet profil, keverési fordulatszám, adagolási sebesség) befolyásolja a felvett spektrumok minőségét. Többváltozós kalibrációs modellek felállítása, s anyagokénti kidolgozása jelentős mennyiségű kísérleti adat felvételével és különböző kemometriai módszerek alkalmazásával válhat lehetővé. Szükség van tehát az adott körülmények figyelembevételével kialakított kalibrációs eljárások kidolgozására. További tisztázandó kérdésként merül fel a szemcseméret-eloszlás lehetséges hatása a valós idejű Raman spektrumokra. A szilárd fázisban – off-line – elvégzett kalibrációk nem alkalmazhatók automatikusan, hiszen a Raman spektrumbeli intenzitás a kristályok méretének ingadozására érzékenyen reagál [89], valamint tovább ronthatja a felvett spektrumok minőségét a kristályok méretétől és a keverés intenzitásától függő fizikai fényszóródás jelensége. A segédanyagok jelenlétében végzett kristályosítások lejátszódásának pontos mechanizmusa még nem tekinthető ismertnek, részletes tisztázására szintén további kísérleti eredmények szükségesek.

A vázolt kérdések tisztázása jelentős előrelépést jelentene abban az irányban, hogy az in-line Raman technikával, valamint a segédanyagokkal kombinált kristályosítás a jelenlegi kutatási szintről eljusson a széles körű ipari alkalmazásra.

IRODALOM

1. Farkas, B., Révész, P.: Kristályosítástól a tablettázásig: Anyagvizsgálati módszerek és technológiai eljárások kézikönyve, Universitas Szeged Kiadó, 2007.
2. Otsuka, M., Kaneniva, N.: J. Pharm. Sci. 75. 506-511 (1986).
3. Pirttimäki, J., Laine, E., Ketola, J., Paronen, P.: Inter. J. Pharm. 95. 93-99 (1993).
4. Pratiwi, D., Fawcett, J.P., Gordon, K.C., Rades, T.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 54. 337-341 (2002).
5. Német, Z., Hegedűs, B., Szántay, Jr, C., Sztatisz, J., Pokol, G.: Thermochim. Acta. 430. 35-41 (2005).
6. Lehto, V.P., Tenho, M., Vaha-Heikkilä, K., Harjunen, P., Paalysaho, M., Valisaari, J., Niemela, P., Jarvinen, K.: Powder Technol. 167. 85-93 (2006).

7. Févotte, G.: Chem. Eng. Res. Des. 85. 906-920 (2007).
8. Warterig, S., Neubert, R.H.H.: Adv. Drug Deliver. Rev. 57. 1144-1170 (2005).
9. Johansson, J., Pettersson, S., Taylor, L.S.: J. Pharm. Biom. Anal. 30. 1223-1231 (2002).
10. Aina, A., Hargreaves, M. D., Matousek, P., Burley, J. C.: Analyst. 135. 2328-2333 (2010).
11. Mullin, J.W., Nyolt, J.: Chem. Eng. Sci. 26. 369-377 (1971).
12. Rawlings, J.B., Witkowski, W.R., Eaton, J.W.: Powder Technol. 69. 3-9 (1992).
13. Hu, Q., Rohani, S., Wang, D.X., Jutan, A.: Powder Technol. 156. 170-176 (2005).
14. Chung S. H., Ma D. L., Braatz R. D.: Can. J. Chem. Eng. 77. 590-596 (1999).
15. Choong K. L., Smith R.: Chem. Eng. Sci. 59. 313-327 (2004).
16. Togkalidou T., Braatz R. D., Johnson B. K., Davidson O., Andrews A.: AIChE J. 47. 160-168 (2001).
17. Rawlings J. B., Miller S. M., Witkowski R. W.: Ind. Eng. Chem. Res. 32. 1275-1296 (1993).
18. Sarkar, D., Rohani, S., Jutan, A.: Chem. Eng. Sci. 61. 5282-5295 (2006).
19. Giron, D.: Thermochim. Acta. 248. 1-59 (1995).
20. Yu, L., Reutzel, S.M., Stephenson, G.A.: Pharm. 1. 118-127 (1998).
21. Eggers, J., Kempkes, M., Cornel, J., Mazzotti, M., Koschinski, I., Verdurand, E.: Chem. Eng. Sci. 64. 163-171 (2009).
22. Fujiwara, M., Chow, P.S., Ma, D.L., Braatz, R.D.: Cryst. Growth Des. 2. 363-370 (2002).
23. Févotte, G., Calas, J., Puel, F., Hoff, C.: Int. J. Pharm. 273. 159-169 (2004).
24. O'Sullivan, B., Glennon B.: Org. Process Res. Dev. 9. 884-889 (2005).
25. Braatz, R.D.: Annu. Rev. Control. 26. 87-99 (2002).
26. Barrett, P., Glennon, B.: Trans IChemE. 80, 799-805 (2002).
27. Schwartz, A.M., Berglund, K.A.: J. Cryst. Growth. 203. 599-603 (1999).
28. Tamagawa, R.E., Miranda, E.A., Berglund, K.A.: Cryst. Growth Des. 2. 511-514 (2002).
29. Tamagawa, R.E., Miranda, E.A., Berglund, K.A.: Cryst. Growth Des. 2. 263-267 (2002).
30. Jiang, S., H. ter Horst, J., Jansens, P. J.: Cryst. Growth Des. 8. 37-43 (2008).
31. Jiang, S., H. ter Horst, J., Jansens, P. J.: Control over polymorph formation of o-aminobenzoic acid, Proceedings 17th International Symposium on Industrial Crystallization (ISIC 17) (2008).
32. Wang, F., Wachter, J.A., Antosz, F.J., Berglund, K.A.: Org. Proc. Res. Dev. 4. 391-395 (2000).
33. Falcon, J.A., Berglund, K.A.: Cryst. Growth Des. 4. 457-463 (2004).
34. Starbuck, C., Spartalis, A., Wai, L., Wang, J., Fernandez, P., Lindemann, C.M., Zhou, G.X. Ge, Z.: Cryst. Growth Des. 2. 515-522 (2002).
35. Ono, T., ter Horst, J.H., Jansens, P.J.: Cryst. Growth Des. 4. 465-469 (2004).
36. Ono, T., Kramer, H.J.M., ter Horst, J.H. Jansens, P.J.: Cryst. Growth Des. 4. 1161-1167 (2004).
37. Schöll, J., Bonalumi, D., Vicum, L., Mazzotti, M., Muller, M.: Cryst. Growth Des. 6. 881-891 (2006).
38. Qu, H.Y., Alatalo, H., Hatakka, H., Kohonen, J., Louhi-Kultanen, M., Reinikainen, S-P., Kallas, J.: J. Cryst. Growth. 311. 3466-3475 (2009).
39. Hu, Y.R., Liang, J.K., Myerson, A.S., Taylor, L.S.: Ind. Eng. Chem. Res. 44. 1233-1240 (2005).
40. Hu, Y., Wikström, H., Byrn, S.R., Taylor, L.S.: J. Pharmaceut. Biomed. 45. 546-551 (2008).
41. Kobayashi, R., Fujimaki, Y., Ukita, T., Hiyama, Y.: Org. Proc. Res. Dev. 10. 1219-1226 (2006).
42. Caillet, A., Puel, F. Févotte, G.: Int. J. Pharm. 307. 201-208 (2006).
43. Caillet, A., Puel, F. Févotte, G.: Chem. Eng. Process. 47. 377-382 (2008).
44. Caillet, A., Rivoire, A., Galvan, J-M., Puel, P., Févotte, G.: Cryst. Growth Des. 7. 2080-2087 (2007).
45. Caillet, A., Sheibat-Othman, N., Févotte, G.: Cryst. Growth Des. 7. 2088-2095 (2007).
46. Qu, H., Louhi-Kultanen, M., Rantanen, J. Kallas, J.: Cryst. Growth Des. 6. 2053-2060 (2006).
47. Qu, H., Kohonen, J., Louhi-Kultanen, M., Reinikainen, S-P., Kallas, J.: Ind. Eng. Chem. Res. 47. 6991-6998 (2008).
48. O'Brien, L.E., Timmins, P., Williams, A.C., York, P.: J. Pharmaceut. Biomed. 36. 335-340 (2004).
49. Klug, D.L.: The influence of impurities and solvents on crystallisation. In: Myerson, A. (Ed.), Handbook of Industrial Crystallization. Butterworth-Heinemann, Boston, 1993. 65-87. old.
50. Weissbuch, I., Leiserowitz, L., Lahav, M.: Tailor-made additives and impurities. In: Mersmann, A. (Ed.), Crystallization Technology Handbook. Marcel Dekker, New York, 1995. 401-457. old.
51. Rasenack, N., Müller, B.W.: Int. J. Pharm. 245. 9-24 (2002).
52. Mullin, J.W.: Industrial Crystallization. Butterworth-Heinemann, London. 1993.
53. Garnier, S., Petit, S., Coquerel, G.: J. Cryst. Growth. 234. 207-219 (2002).
54. Chow, K.Y., Go, J., Mehdizadeh M., Grant, D.J.W.: Int. J. Pharm. 20. 3-34 (1984).
55. Duddu, S.P., Fung, F.K.Y., Grant, D.J.W.: Int. J. Pharm. 127. 53-63 (1996).
56. Khan, M.A., Bolton, S., Kislalioglu, M.S.: Int. J. Pharm. 102. 185-192 (1994).
57. Nokhodchi, A., Bolourtchian, N., Dinarvand, R.: J. Cryst. Growth. 274. 573-584 (2005).
58. Abd El-Bary, A., Kassem, M.A.A., Foda, N., Tayel, S., Badawi, S.: Drug Dev. Ind. Pharmacy. 16. 1649 - 1660 (1990).
59. Thompson, C., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B., Wilkinson, M.J.: Int. J. Pharm. 280. 137-150 (2004).
60. Lipp, R.: J. Pharm. Pharmacol. 50. 1343-1349 (1998).
61. Ma, X., Taw, J., Chiang, C.-M.: Int. J. Pharm. 142. 115-119 (1996).
62. Usui, F., Maeda, K., Kusai, A., Nishimura, K., Yamamoto, K.: Int. J. Pharm. 154. 59-66 (1997).
63. Femi-Oweyo, M.N., Spring, M.S.: Int. J. Pharm. 112. 17-28 (1994).
64. Taylor, L.S., Zografi, G.: Pharm. Res. 14. 1691-1698 (1997).
65. Kumar, S., Chawla, G., Bansal, A.K.: J. Pharm. Soc. Japan 128. 281-289 (2008).
66. Fuerstenau, D.W.: J. Colloid Interf. Sci. 256. 79-90 (2002).
67. Szekeres, M.: Szilícium-oxid alapú szorbensek gázadszorpció és oldatadszorpció tulajdonságai, PhD. Értekezés. 2003.

68. *Garti, N., Zour, H.*: J. Cryst. Growth. 172. 486-498 (1997).
69. *Guang Wei, Lu., Hawley, M., Smith, M., Geiger, B.M., Pfund, W.*: J. Pharm. Sci. 95. 305-317 (2005).
70. *Qu, H., Louhi-Kultanen, M., Kallas, J.*: Cryst. Growth Des. 7. 724-729 (2007).
71. *Agarwal, P., Berglund, K.A.*: Cryst. Growth Des. 3. 941-946 (2003).
72. *Gift, A.D., Luner, P.E., Luedeman, L., Taylor, L.S.*: J. Pharm. Sci. 97. 5198-5211 (2008).
73. *Rodríguez-Hornedo, N., Nehm, S.J., Seefeldt, K.F., Pagan-Torres, Y., Falkiewicz, C.J.*: Mol. Pharm. 3. 362-367 (2006).
74. *Raghavan, S.L., Trividic, A., Davis, A.F., Hadgraft, J.*: Int. J. Pharm. 212. 213-221 (2000).
75. *Usui, F., Maeda, K., Kusai, A., Ikeda, M., Nishimura, K., Yamamoto, K.*: Int. J. Pharm. 170. 247-256 (1998).
76. *Martínez-Ohárriz, M.C., Martín, C., Goñi, M.M., Rodríguez-Espinosa, C., Tros-Ilarduya, M.C., Zornoza, A.*: Eur. J. Pharm. Sci. 8. 127-132 (1999).
77. *Bonsdorff-Nikander, A., Rantanen, J., Christiansen, L., Yliruusi, J.*: Optimizing the Crystal Size and Habit of β -Sitosterol in Suspension, AAPS PharmSciTech 4. 2003.
78. *Mackellar, A. J., Buckton, G., Newton, J.M., Chowdhry, B.Z., Orr, C.A.*: Int. J. Pharm. 112. 65-78 (1994).
79. *Chiou, W. L., Chen, S-J., Athanikar, N.*: J. Pharm. Sci. 65. 1702-1704 (1976).
80. *Grekan, H.A., Ford, J.L., Rubinstein, M.H., Rabaji-Siahboomi, A.R.*: Int. J. Pharm. 208. 87-99 (2000).
81. *Grekan, H. A., Ford J.L., Rubinstein, M.H., Rabaji-Siahboomi, A.R.*: Int. J. Pharm. 208. 101-110 (2000).
82. *Xie, S., Poornachary, S.K., Chow, P.S., Tan, R.B.H.*: Cryst. Growth Des. 10. 3363-3371 (2010).
83. *Yu, L.X., Lionberger, R.A., Raw, A.S., D'Costa, R., Wu, H., Hussain, A.S.*: Adv. Drug Deliver. Rev. 5. 349- 369 (2004).
84. *Vrbinc, M., Jordan, K.B., Smrkolj, M., Vrecer, F.*: Acta Chim. Slov. 54. 254-267 (2007).
85. *Rodríguez-Hornedo, N., Murphy, D.*: J. Pharm. Sci. 88. 651-660 (1999).
86. *Simonelli, A.P., Mehta, S.C., Higuchi, W.I.*: J. Pharm. Sci. 59. 633-638 (1970).
87. *Ziller, K.H., Rupprecht, H.*: Drug. Dev. Ind. Pharm. 14. 2341-2370 (1998).
88. *Tian, F., Baldursdottir, S., Rantanen, J.*: Mol. Pharm. 6. 202-210 (2009).
89. *Pellow-Jarman, M.V., Hendra, P.J., Lehnert, R.J.*: Vib. Spectrosc. 12. 257-261 (1996).

Érkezett: 2011. június 25.

Új enzimes stratégiák laktám és aminosav enantiomerek szintézisére*

FORRÓ ENIKŐ

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerkémiai Intézet, 6720 Szeged, Eötvös utca 6.

Levelezési cím: Forro.Eniko@pharm.u-szeged.hu

Summary

Forró, E.: *New enzymatic strategies for enantiopure lactams and amino acids*

To fulfil the requirements of modern go-ahead research, new direct and indirect enzymatic strategies and new techniques have been devised for the preparation of enantiopure β - and γ -lactams and β - and γ -amino acids, and some of them have been scaled up. For example, a formal total synthesis of enantiopure Anatoxin-a, a neurotoxic alkaloid, but a potent and stereospecific agonist at nicotinic acetylcholine receptors has been introduced. An efficient and very simple method has been developed for the synthesis of the antibacterial cispentacin [(1R,2S)-2-amino-1-cyclopentanecarboxylic acid] and 8 new derivatives. A highly efficient enzymatic procedure has been elaborated for the synthesis of the blockbuster drug Abacavir and Carbovir intermediate (1S,4R)-4-aminocyclopent-2-ene-1-carboxylic acid. The first enzymatic method has been devised for the synthesis of (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butanoic acid, the intermediate for the new antidiabetic drug Sitagliptine. Direct enzymatic strategies have been reported for the synthesis of (2R,3S)-3-phenylisoserine, a key intermediate of the side-chain of the antitumor product Taxol. A new enzymatic method has been developed for the total synthesis of crispine A enantiomers with antitumor activity.

As amino acids are among the main products in the above-mentioned enzymatic methods, a new gas-chromatographic method has been acquired for the enantioseparation of acyclic and carbocyclic cis- and trans- β -amino acids via a rapid double derivatization technique (esterification followed by N-acylation).

Applicability

Through the utilization of enzymes, efficient enantioselective procedures in organic media have been developed and applied for the preparation of enantiopure, biologically active β - and γ -lactams and β - and γ -amino acids (Scheme 15). Two of our recently elaborated enzymatic methods for the synthesis of β - and γ -amino acids have been patented. Acros Organics and BioBlocks Inc. serve as the sales companies of more than 20 enantiopure products that we have prepared by enzymatic methods.

Keywords: Abacavir, amino acid, Anatoxin-a, Carbovir, Cispentacin, Crispine A, double derivatization, enzyme, lactam, Sitagliptin, Taxol

Összefoglalás

Az enantiomertiszta természetes anyagok szintézisére irányuló törekvéseknek, valamint a korszerű gyógyszerkutatási és gyógyszerbevezetési elveknek (enantiomertiszta farmakonok előállítására) megfelelően, hatékony, új és egyszerű direkt és indirekt enzimes módszereket fejlesztettünk és méretnöveltünk enantiomertiszta értékes β - és γ -laktámok és β - és γ -aminosavak szintézisére. Így pl. formális totál-szintézist adtunk meg a nikotinos acetilkolin receptorra sztereospecifikus agonista enantiomertiszta Anatoxin-a szintézisére. Előállítottuk a gombaellenes hatással bíró cispentacint [(1R,2S)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav] és 8 új analóg és homológ származékát. Megvalósítottuk az antivirális Abacavir és Carbovir értékes intermediérének, az (1S,4R)-4-aminociklopent-2-én-1-karbonsavnak a szintézisét. Kidolgoztuk az első enzimes utat a 2-es típusú diabetes kezelésére alkalmazott Sitagliptin intermedier (R)-3-amino-4-(2,4,5-trifluor-fenil)butánsav szintézisére. Több direkt enzimes stratégiát is kidolgoztunk és alkalmaztunk sikeresen a daganatos megbetegedések kezelésére használt Taxol oldallánc kulcs-intermediérének, a (2R,3S)-3-fenilizoserinnak az előállítására. Új, enzimes eljárást dolgoztunk ki a daganatellenes Kriszpin A enantiomerek totál szintézisére.

Mivel a fentiekben említett enzimes munkánk egyik terméke legtöbb esetben aminosav volt, az enzimes reakciók követésére és aminosavak enantiomerfelelőének a meghatározására új, általunk dupla derivatizálás elnevezés alatt bevezetett gázkromatográfiás módszert (észterezés és ezt követő N-acilezés) dolgoztunk ki karbociklusos cisz és transz, valamint aciklusos β -aminosavak enantioszeparálására.

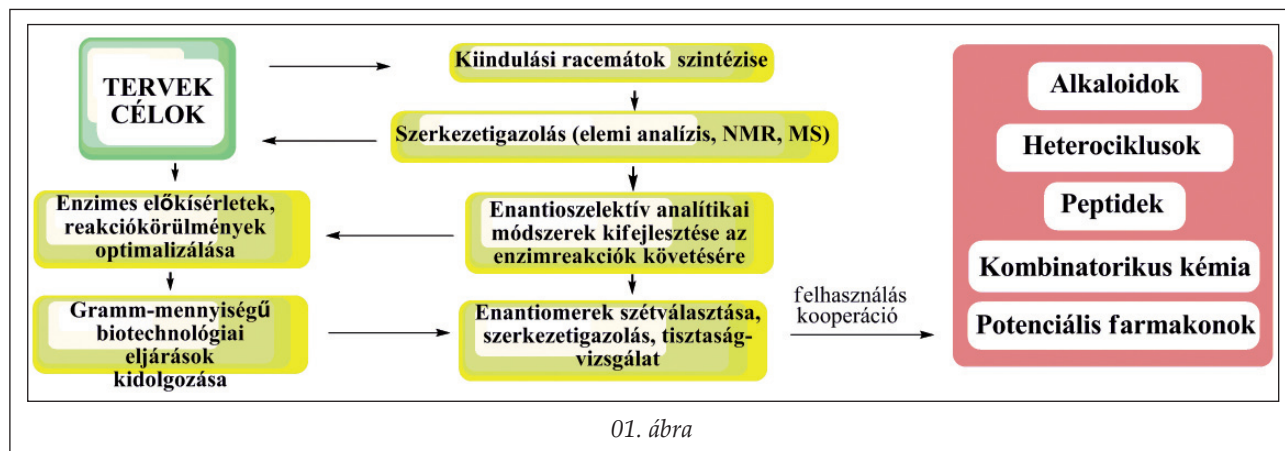
Alkalmazási lehetőségek: Két, a β - és γ -aminosavak szintézisére kidolgozott enzimes eljárásunk iparjogvédelme megtörtént. Az általunk kidolgozott enzimes módszerekkel készült enantiomerek közül több mint 20 enantiomerünket az Acros Organics és BioBlocks Inc. vállalatok forgalmazzák. Bizonyítottuk, hogy a szerves közegű enzim-katalizált rezolválások kiválóan alkalmazhatók enantiomertiszta, biológiailag aktív β - és γ -laktámok, valamint β - és γ -aminosavak előállítására (15. ábra).

Kulcsszavak: Abacavir, aminosav, Anatoxin-a, Carbovir, Cispentacin, dupla derivatizálás, enzim, Kriszpin A, laktám, Sitagliptin, Taxol.

A jövő biokatalizátoraiként is emlegetett enzimek ipari felhasználása egyre hangsúlyozottabb, 10-12 nagyságrenddel gyorsíthatják a reakciókat, enyhe

körülmények között működnek, és ami a legfontosabb, hogy szelektíven (kemo-, régió- és enantio-szelektíven) irányíthatják a reakciókat. Enantio-diszkriminatív tulajdonságuknak köszönhetően az enantiomer laktám és aminosav előállítására fókuszáló munkáinkhoz, az utóbbi időben egyre

*MTA doktori értekezés védésén (2011. június 27.) elhangzott előadás alapján készült közlemény



dinamikusabban fejlődő környezetbarát enzim-katalizált kinetikus rezolválás mellett döntöttünk. A reakciókat nem a szokásos vizes, hanem a számos előnnyel bíró organikus fázisban végeztük.

Új tudományos eredmények

Az egyes munkákon belül jól elkülöníthető lépések követik egymást: a racém szubszttrát szintézise; az enzim reakció követésére alkalmas analitikai módszer kidolgozása; az optimalizálási, félmikrométerű enzim reakciók kivitelezése (enzim, acil donor vagy nukleofil, oldószer, adalék, hőmérséklet stb. enantioszelektivitásra és reakció sebességére gyakorolt hatásának vizsgálata); a preparatív-mennyiségű enzim rezolválás; a termékek izolálása és jellemzése (01. ábra). Az enzim előkísérletek során hangsúlyt kívántunk fektetni arra is, hogy természetbarát körülményeket találjunk, pl. a környezetre kevésbé káros „zöld” oldószerek használatával.

A reakciók előrehaladását a konverzió számításával [(3), ahol az A_1 - A_4 az alapvonalra elválasztott enantiomercsúcsok területintegráljait jelentik és $A_2 > A_1$, valamint $A_3 > A_4$] adtuk meg (02. ábra). A termékek enantiomerfeleslegét (ee) az (1) és (2) képletek segítségével számítottuk, míg az enzim reakciókra jellemző enantioszelektivitási, dimenzió nélküli érték (E ; azt mutatja meg, hogy egyik enantiomer hányszor gyorsabban alakul terméké, mint az antipódja) számítása a (4) képlet sze-

rint történt. A meghatározásokhoz királis oszloppal (Chromopack Chirasil-Dex CB, Chir-L-Val, Supelco Gamma-Dex™ 225) felszerelt gázkromatográfot (GC), ill. királis oszloppal (Chiralpak IA, Chirobiotic TAG, APEX Octadecyl 5 μ) felszerelt folyadékkromatográfot (HPLC) használtunk.

Az enantiomertiszta termékeket szerkezetigazolással (^1H -, ^{13}C -NMR, Bruker DRX 400, 500), olvadáspont-méréssel (Kofler készülék), az ee [Varian GC (3900), ill. Jasco HPLC (quaternary gradient pump PU-2089plus, multiwavelength detector MD-2010plus)] és az optikai forgatóképesség, α (Perkin Elmer 341) értékek megadásával jellemeztük.

Jelen közleményben az értekezéssel megegyező vegyületszámozást alkalmaztam.

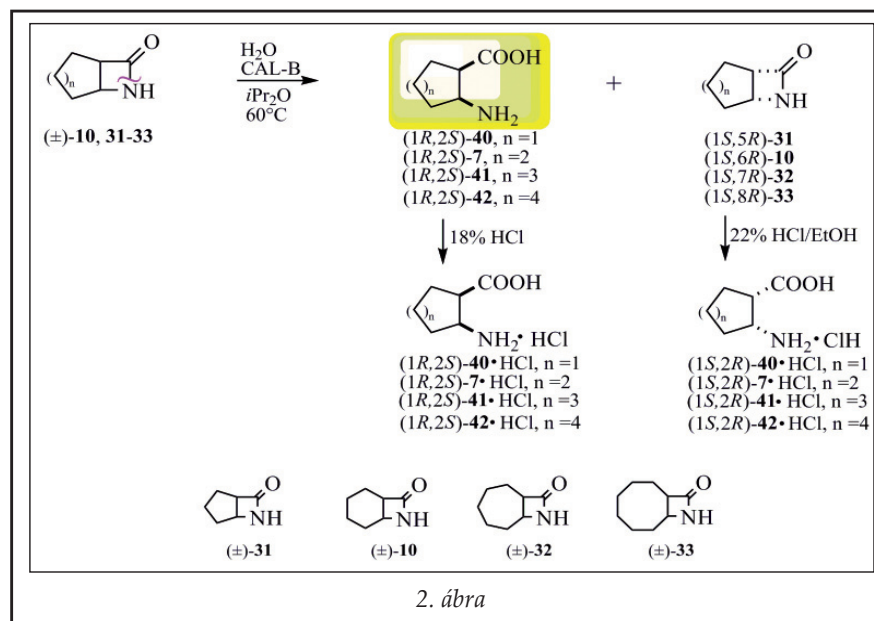
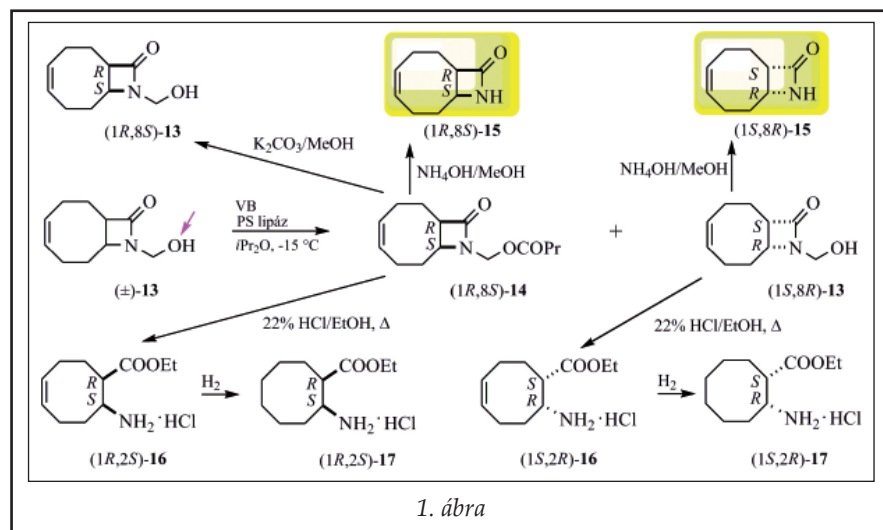
Indirekt enzimikus módszerek

Az Anatoxin-a enantiomerek formális totál-szintézise

Az enantiomertiszta Anatoxin-a (a nikotinos acetilkolin receptorra sztereospecifikus agonista, igen erős idegméreg) előállítására formális totál szintézist dolgoztunk ki a 9-(hidroxi-metil)-9-aza-biciklo[6.2.0]dek-4-én-10-on [(±)-13] lipáz-katalizált aszimmetrikus O-acilezésén keresztül (1. ábra) [1a]. A reakció sebességének és enantioszelektivitásának optimalizálásánál korábbi tapasztalatainkat [1b] is figyelembe vettük, a legjobb enantioszelektivitást ($E = 94$) akkor értük el, amikor a primer OH acilezését 2 ekvivalens vinil-acetáttal, Celitre immobilizált PS lipáz jelenlétében, diizopropil-éterben, -15 °C-on végeztük. Az enantiomerdús alkohol [(1S,2R)-13] és észter [(1R,2S)-14] termékeket ($ee \geq 92\%$) oszlopkromatográfias szétválasztásuk után, ammónium-hidroxid-

$$\begin{aligned}
 (1) \quad ee_S &= \frac{A_3 - A_4}{A_3 + A_4} & (3) \quad \text{konv.} &= \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} & (4) \quad E &= \frac{\ln \frac{(1-ee_S)}{(1+ee_S/ee_P)}}{\ln \frac{(1+ee_S)}{(1+ee_S/ee_P)}} \\
 (2) \quad ee_P &= \frac{A_2 - A_1}{A_1 + A_2}
 \end{aligned}$$

02. ábra



találta. Kiváló enantioszelektivitás ($E_{\text{acilezés}}$ és $E_{\text{hidrolízis}} > 200$) jellemezte a 4-fenil-2-azetidion enzimés rezolválásait, míg a 4-(*p*-tolil)-2-azetidion esetében végzett enzimés rezolválások esetében alacsonyabb értékeket tapasztaltunk ($E_{\text{acilezés}} = 57$, $E_{\text{hidrolízis}} = 89$).

Direkt enzimés módszerek

A Cispentacin és enantiomer-tiszta származékainak előállítása β-laktámok enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül

Nem aktivált karbociklusos és aciklusos β-laktámok lipáz-katalizált enantioszelektív metanolízisét [2a] követően, igen hatékony és egyszerű direkt enzimés módszert dolgoztunk ki elsőként karbociklusos *cis* β-aminosavak szintézisére a megfelelő, nem védett β-laktámok [(±)-10, 31–33] szerves közegű enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül (2. ábra) [2b].

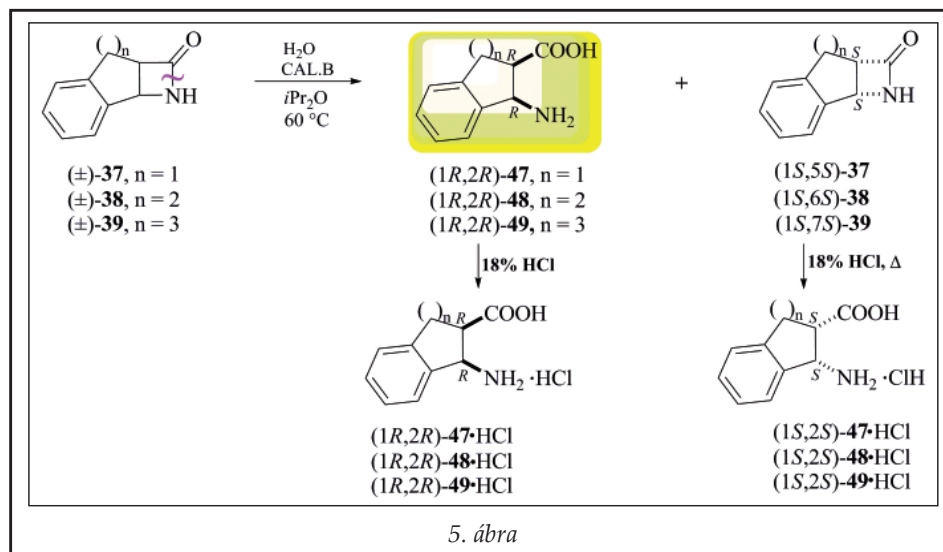
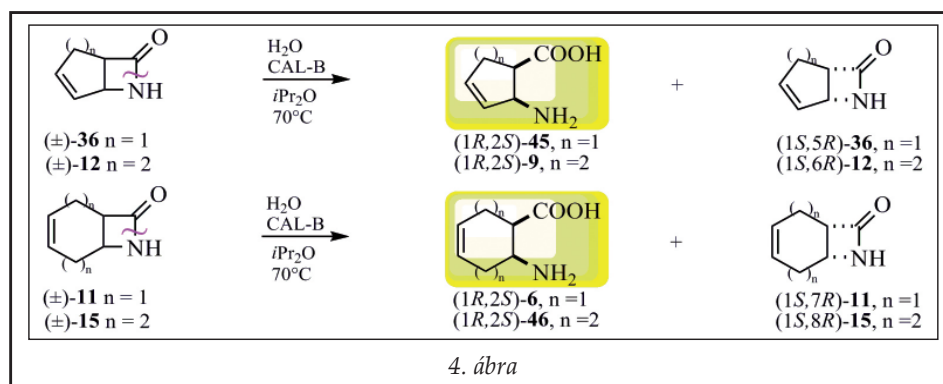
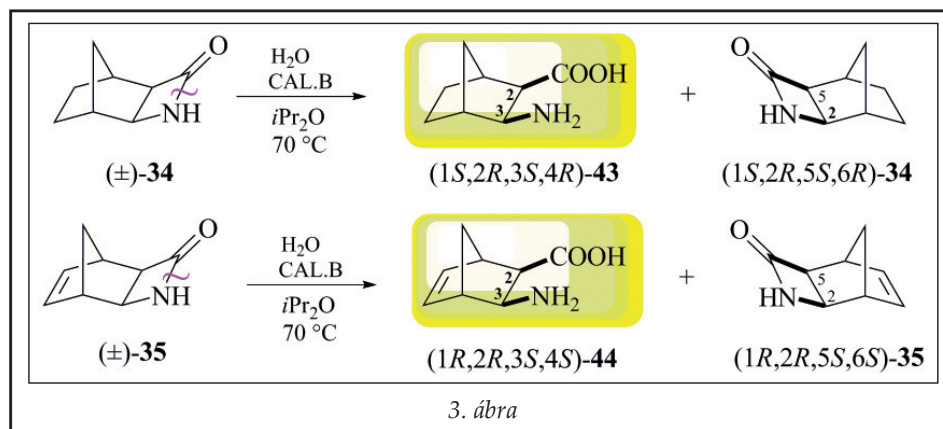
A kiváló enantioszelektivitással ($E > 200$) zajló reakciókból [*Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) katalízissal, 1 ekvivalens hozzáadott vízzel,

diizopropiléterben, 60 °C-on] nagy enantiomerfelesleggel ($ee \geq 93\%$) és jó termeléssel ($\geq 72\%$) kaptuk a termékeket. A módszer egyik nagy előnye, hogy a termék aminosav [(1R,2S)-7, 40–42] és nem reagált laktám [(1S,6R)-10, (1S,5R)-31, (1S,7R)-32 és (1S,8R)-33] enantiomerek szétválasztását egyszerű módon, szerves-vizes extrakcióval végeztük. Az eljárást méretnöveltük és grammos tételekben állítottuk elő a gombaellenes aktivitású cispentacint [(1R,2S)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav hidroklorid [(1R,2S)-40·HCl; $ee \geq 99\%$,] és másik 3 homológját [(1R,2S)-7·HCl, 41·HCl és 42·HCl; $ee \geq 96\%$].

Direkt enzimés eljárást dolgoztunk ki az 1,4-etil- és 1,4-etilén-áthidalt cispentacin, új cispentacin származékok előállítására, a megfelelő racém *exo*-3-aza-triciklo[4.2.1.0^{2,5}]nonán-4-on és *exo*-3-aza-triciklo[4.2.1.0^{2,5}]non-7-én-4-on *Candida antarctica* B

diizopropiléterben, 60 °C-on] nagy enantiomerfelesleggel ($ee \geq 93\%$) és jó termeléssel ($\geq 72\%$) kaptuk a termékeket. A módszer egyik nagy előnye, hogy a termék aminosav [(1R,2S)-7, 40–42] és nem reagált laktám [(1S,6R)-10, (1S,5R)-31, (1S,7R)-32 és (1S,8R)-33] enantiomerek szétválasztását egyszerű módon, szerves-vizes extrakcióval végeztük. Az eljárást méretnöveltük és grammos tételekben állítottuk elő a gombaellenes aktivitású cispentacint [(1R,2S)-2-amino-1-ciklopentánkarbonsav hidroklorid [(1R,2S)-40·HCl; $ee \geq 99\%$,] és másik 3 homológját [(1R,2S)-7·HCl, 41·HCl és 42·HCl; $ee \geq 96\%$].

Direkt enzimés eljárást dolgoztunk ki az 1,4-etil- és 1,4-etilén-áthidalt cispentacin, új cispentacin származékok előállítására, a megfelelő racém *exo*-3-aza-triciklo[4.2.1.0^{2,5}]nonán-4-on és *exo*-3-aza-triciklo[4.2.1.0^{2,5}]non-7-én-4-on *Candida antarctica* B



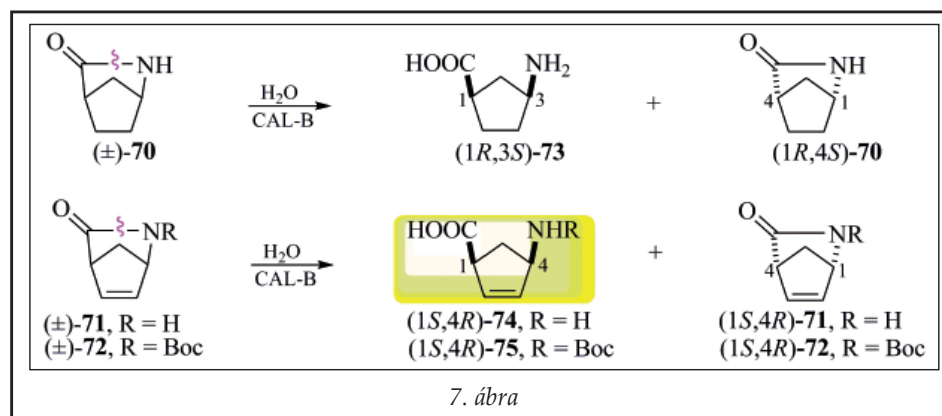
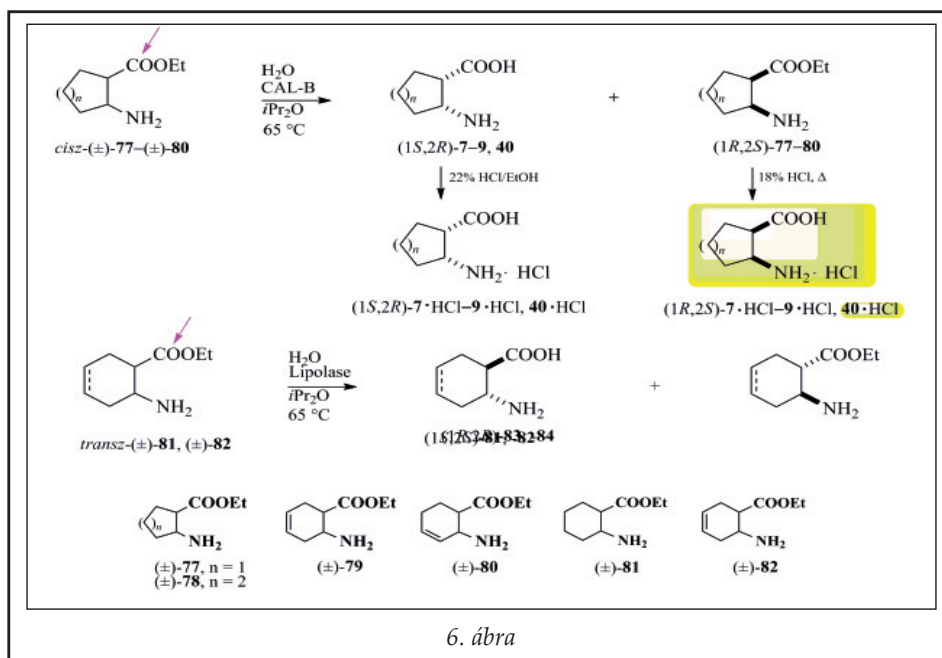
lipáz (Lipolase)-katalizált enantioszelektív ($E > 200$) gyűrűnyitásban keresztül (3. ábra) [2c]. Az 1 ekvivalens hozzáadott vízzel, diizopropiléterben, 70°C -on végzett reakciók, nagy enantiomerfelesleggel ($\geq 98\%$) és jó termeléssel eredményeztek termékeket ($\geq 80\%$) szerves-vizes extrakcióval választottuk szét.

További funkcionizálás lehetőségét kínálva, telítetlen karbociklusos *cisz*-2-amino-1-cikloalkán-karbonsavakat [(1R,2S)-6, 9, 45, 46] szintetizáltunk jó termeléssel ($\geq 90\%$) és nagy enantiomerfeles-

leggel ($ee \geq 95\%$), a megfelelő telítetlen racém β -laktámok *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizált enantioszelektív ($E > 200$) gyűrűnyitásban keresztül (4. ábra). A reakciókat 1 ekvivalens hozzáadott vízzel, diizopropiléterben, 70°C -on végeztük [2d].

Kiváló enantiomerfelesleggel ($ee \geq 96\%$) állítottuk elő a benzocisz-pentacint [(1R,2R)-47 \times HCl és új, hat-[(1R,2R)-48 \times HCl]], ill. héttagú [(1R,2R)-49 \times HCl]] homológjait. A racém 3,4-benzo-6-aza-biciklo[3.2.0]heptán-7-on [(±)-37], a 4,5-benzo-7-aza-biciklo[4.2.0]oktán-8-on [(±)-38] és az 5,6-benzo-8-aza-biciklo[5.2.0]nonán-9-on [(±)-39] enantioszelektív gyűrűnyitását ($E > 200$) *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizissal, 1 ekvivalens hozzáadott vízzel, $i\text{Pr}_2$ -ben, 60°C -on végeztük (5. ábra) [2e]. Fontos megjegyezni, hogy a *Candida antarctica* B lipáz enantiopreferenciája a korábbiakban bemutatott gyűrűnyitásokhoz képest nem, csupán a királis centrumhoz kötődő szubsztituensek prioritási sorrendje változott.

Környezetkímélő, oldószermentes, *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase)-katalizált eljárást optimalizáltunk mono-, bi- és triciklusos, valamint 4-aril-szubsztituált β -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitására. A szerves oldószerben végzett reakciókkal összehasonlítva, viszonylag lassúbb reakciókat tapasztaltunk, az enantioszelektivitási értékek azonban változatlanul kiválóak ($E > 200$) voltak. A reakciók sebességét az enzim mennyiségének növelésével gyorsítottuk, az enzim újrafelhasználásával pedig a módszert gazdaságossá tettük. Az új, „zöld”



módszert sikeresen alkalmaztuk a ciszpentacín és különböző származékainak enantiomertiszta formában történő előállítására [2f].

A Cispentacin és enantiomertiszta származékainak előállítása β -aminoészterek enantioszelektív hidrolízisén keresztül [3, 9a]

Új enzimes eljárást dolgoztunk ki karbociklusos *cisz* [(±)-77–80] és *transz* [(±)-81 és (±)-82] β -aminoészterek enantioszelektív hidrolízisére, szerves közegben (6. ábra). Nagy enantioszelektivitást (E általában > 100) értünk el úgy, hogy a hidrolízist *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) katalízissel, 0,5 ekvivalens hozzáadott vízzel, diizopropiléterben, 65 °C-on végeztük. Az eljárással jó termeléssel állítottunk elő mind *cisz* ($\geq 84\%$), mind pedig *transz* ($\geq 88\%$) enantiomertiszta ($ee \geq 96\%$) β -aminosavakat [köztük a ciszpentacint [(1R,2S)-40 \times HCl, $n=1$]].

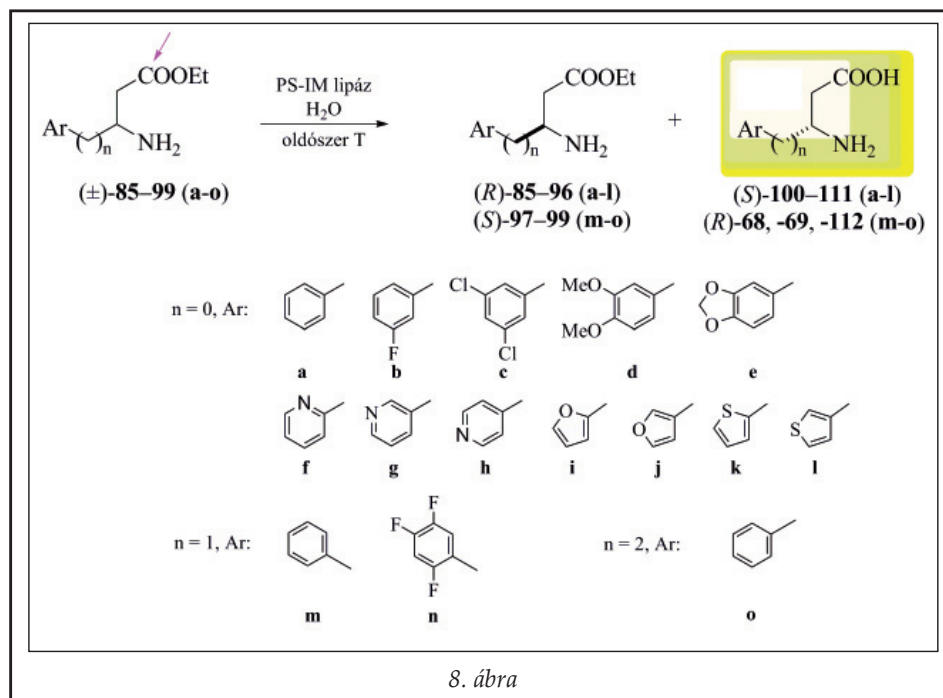
Az Abacavir és Carbovir intermedierjének enantiomertiszta formában való előállítása γ -laktámok enantioszelektív gyűrűnyitásán keresztül [4, 9b]

Kidolgoztunk egy új enzimes eljárást mind N-védett [(±)-72], mind pedig szabad NH funkciót [(±)-70, 71] tartalmazó γ -laktámok enantioszelektív hidrolízisére (7. ábra). Kiváló enantioszelektivitást ($E > 200$) értünk el *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) enzimet használva katalizátorként, 0,5 ekvivalens vizet nukleofilként és amikor a reakciókat diizopropiléterben, 30 °C-on vagy 65 °C-on végeztük. A nagy enantiomerfelesleggel ($ee \geq 96\%$), jó termelés mellett ($> 84\%$) kapott el nem reagált γ -laktámot és gyűrűnyílt γ -aminosavat N-védett termékek esetén oszlopkromatográfiásan, szabad NH funkciót tartalmazó termékek esetén

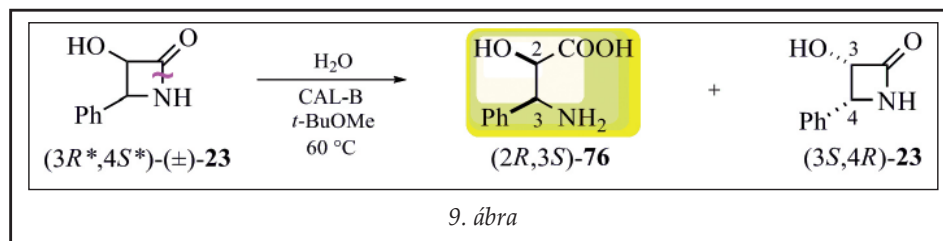
pedig szűréssel választottuk szét. A módszer segítségével preparatív mennyiségben (> 5 g) állítottuk elő az antivirális Abacavir és Carbovir szintézisének kulcs-intermedierjét, az (1S,4R)-4-amino-ciklopent-2-én-1-karbonsavat [(1S,4R)-74].

A Sitagliptin intermedierjének enantiomertiszta formában való előállítása β -aminoészterek enantioszelektív hidrolízisén keresztül

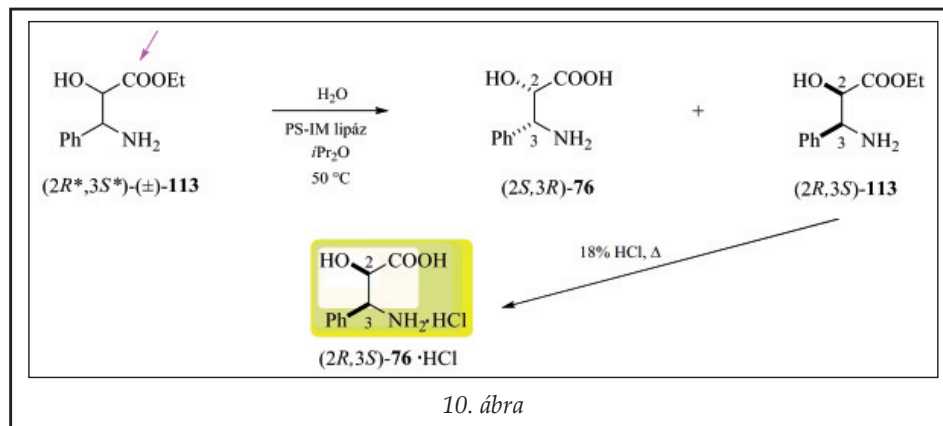
Direkt enzimes eljárást dolgoztunk ki β -aril-szubstituált [(±)-85–(±)-99 (a–e)] [5a], β -heteroaril-szubstituált [(±)-85–(±)-99 (f–l)] [5b] és β -arilalkil-szubstituált [(±)-85–(±)-99 (m–o)] [5c] β -aminoészterek enantioszelektív hidrolízisére (8. ábra). Kiváló enantioszelektivitást ($E > 100$) kaptunk, amikor a reakciókat *Burkholderia cepacia* lipáz [PS (Celitre immobilizált), ill. PS-IM] katalízissel, 0,5 ekvivalens hozzáadott vízzel, szerves közegben (*i*Pr₂O vagy *t*-BuOMe), viszonylag alacsony hőmér-



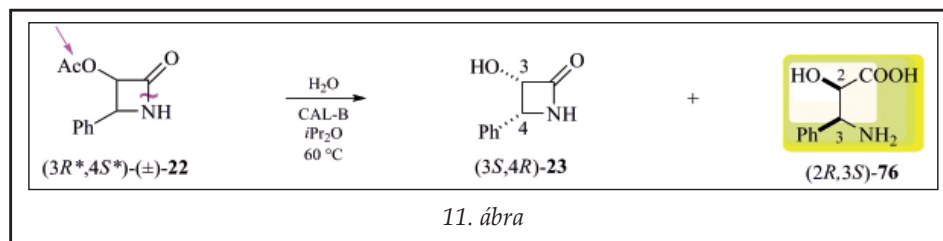
8. ábra



9. ábra



10. ábra



11. ábra

segítségével, elsőként állítottuk elő enzimeseleg, nagy enantiomerfelesleggel ($ee = 97\%$) és jó termékkel (86%) a 2-es típusú diabetes kezelésére alkalmazott Sitagliptin intermedierént $[(R)$ -112 (n)] [5c].

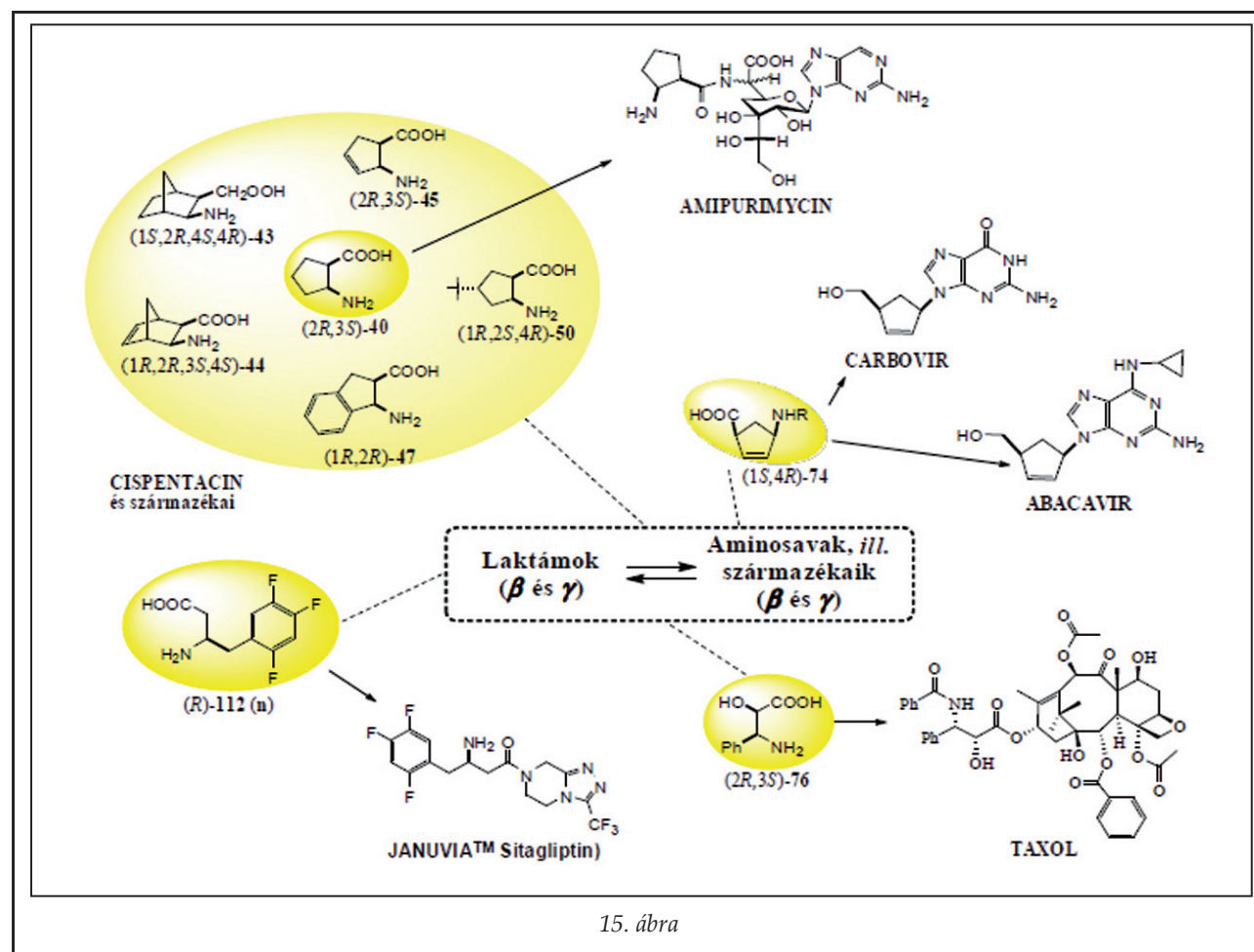
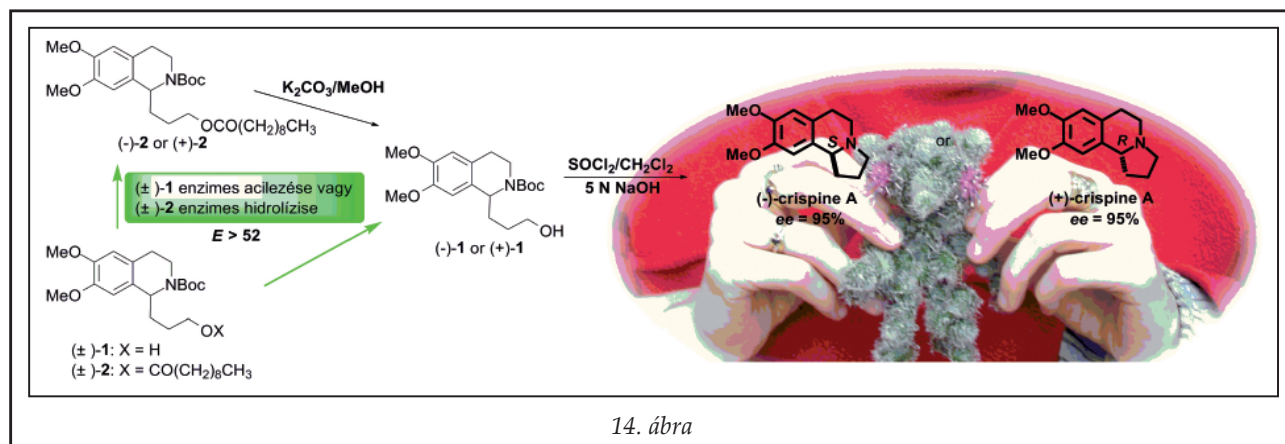
A Taxol oldallánc kulcs-intermedierjének enantiomertiszta formában történő előállítása

Hatékony direkt enzimese stratégiát dolgoztunk ki a racém *cis*-3-hidroxi-4-fenil-2-azetidionon $[(3R^*,4S^*)$ -23] enantioszelektív ($E > 200$) gyűrűnyitására [6a]. A célmolekula $(2R,3S)$ -3-fenilizosze-rint $[(2R,3S)$ -76], a daganatellenes Taxol oldallánc kulcs-intermedierjét kiváló enantiomerfelesleggel ($ee > 98\%$) és jó termékkel (96%) kaptuk, amikor a $(3R^*,4S^*)$ -23 hidrolízisét 0,5 ekvivalens hozzáadott vízzel, *Candida antarctica* B lipáz (Lipolase) katalízissel, t -BuOMe-ben, 60°C -on végeztük (9. ábra). A termékeket szerves-vizes extrakcióval választottuk szét.

Új enzimese stratégiát dolgoztunk ki a $(2R,3S)$ -3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionsav $[(2R,3S)$ -76·HCl] előállítására a racém etil-(3-amino-3-fenil-2-hidroxi-propionát) $[(2R^*,3S^*)-(\pm)$ -113] enantioszelektív hidrolízisen keresztül [6b]. Kiváló enantioszelektivitást ($E > 200$) értünk el PS-IM

sékleten (25 vagy 45°C) végeztük. A termék aminosav enantiomereket szerves-vizes extrakcióval választottuk szét. A módszer

lipázzal, $0,5$ ekvivalens hozzáadott vízzel, diizopropiléterben, 50°C -on és nyertük nagy enantiomerfelesleggel ($ee \geq 98\%$), jó termék mel-



megbízhatóan és lelkesen vettek részt a munkákban. Sok kiindulási racemát szintéziséért mondok köszönetet Árva Judit vegyész üzemtechnológusnak. Mosolyukért köszönetet mondok minden kedves kollégámnak és barátomnak.

Köszönöm a Magyar Tudományos Akadémia (Békésy György Posztdoktori Ösztöndíj, Bolyai János Kutatási Ösztöndíj), a Magyar Ösztöndíj Bizottság (Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj), az Ok-

tatási Minisztérium (FKFP 0115/2001) és az OTKA (46440, 71938) anyagi támogatását.

IRODALOM

1. (a) Forró, E., Árvai, J., Fülöp, F.: Tetrahedron: Asymmetry 12, 643-649 (2001); (b) Kámán, J., Forró, E., Fülöp, F.: Tetrahedron: Asymmetry 11, 1593-1600 (2000); (c) Forró, E., Fülöp, F.: Tetrahedron: Asymmetry 12, 2351-2358 (2001).

2. (a) Park, S., Forró, E., Grewal, H., Fülöp, F., Kazlauskas, R.J.: *Adv. Synth. Catal.* 345, 986-995 (2003); (b) Forró, E., Fülöp, F.: *Org. Lett.* 5, 1209-1212 (2003); (c) Forró, E., Fülöp, F.: *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 573-575 (2004); (d) Forró, E., Fülöp, F.: *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 2875-2880 (2004); (e) Forró, E., Fülöp, F.: *Chem. Eur. J.* 12, 2587-2592 (2006); (f) Forró, E., Fülöp, F.: *Tetrahedron: Asymmetry* 19, 1005-1009 (2008).
3. Forró, E., Fülöp, F.: *Chem. Eur. J.* 13, 6397-6401 (2007).
4. Forró, E., Fülöp, F.: *Eur. J. Org. Chem.* 31, 5263-5268 (2008).
5. (a) Tasnádi, G., Forró, E., Fülöp, F.: *Tetrahedron: Asymmetry* 19, 2072-2077 (2008); (b) Tasnádi, G., Forró, E., Fülöp, F.: *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 1771-1777 (2009); (c) Tasnádi, G., Forró, E., Fülöp, F.: *Org. Biomol. Chem.* 8, 886-895 (2010).
6. (a) Forró, E., Fülöp, F.: *Eur. J. Org. Chem.* 16, 3074-3079 (2010); (b) Forró, E., Fülöp, F.: *Tetrahedron: Asymmetry* 21, 637-639 (2010).
7. Forró, E.: *J. Chromatogr. A* 1216, 1025-1029 (2009).
8. Forró, E., Schönstein, L., Fülöp, F.: *Tetrahedron: Asymmetry* 22, 1255-1260 (2011).
9. (a) Forró, E., Fülöp, F.: PCT WO/2007/091110 A1 (16.08.2007); (b) Forró, E., Fülöp, F.: PCT/WO/2009007759 A1 (15.01.2009).

Érkezett: 2011. szeptember 26.

Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

Közlésre elfogadunk:

1. Összegyűjtő közleményeket, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. Közleményeket, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. Rövid közleményeket, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Felelősen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyel való átdolgozására.

A kézirat elkészítésének módja:

a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

1. Revelle, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: *J. Pharm. Sci.* 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rácz I., Plachy J., Csontos A.: A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei. *Medicina*, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): *Chiral Separations by HPLC*. Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31–68.

Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábíán P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdély-Grúz T. és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; F. Csányi P., Fábíán P. és Hőnyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szervetlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadók.

b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A dolgozat címe (esetleg alcíme).

A szerző(k) teljes neve (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) munkahelye teljes postai címmel, valamint a levelező szerző e-mail címe.

A dolgozat magyar nyelvű összefoglalása.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

Kulcsszavak: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat címe angol nyelven, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

Angol nyelvű összefoglalás.

Bevezetés, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

Key-words: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

Kísérleti rész, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

Eredmények.

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

Az eredmények értékelése.

Ábracímek.

Következtetések. Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges **köszönetnyilvánítások.**

Irodalomjegyzék.

